



Daniela Filipa Martins Gonçalves

***Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, das ESBL's às Carbapenemases, colonização fecal e infeção**

Influência da população idosa numa região do Norte de Portugal

**Tese do 3.º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Doutor em Ciências
Farmacêuticas na Especialidade de Microbiologia**

Orientador:

Professora Doutora Helena Maria Neto Ferreira de Sousa

Faculdade de Farmácia

Universidade do Porto, Portugal

Dezembro de 2013

***Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, das ESBL's às Carbapenemases, colonização fecal e infeção**

Influência da população idosa numa região do Norte de Portugal

Este trabalho foi realizado no Departamento de Ciências Biológicas, Serviço de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (FFUP) e no Laboratório de Microbiologia e Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Braga

De acordo com a legislação em vigor, não é permitida a reprodução de qualquer parte desta tese.

O presente trabalho inclui resultados anteriormente divulgados em:

Gonçalves, D., Cecílio, P., Branca, F., Iglésias, C., Faustino, A., Estrada, A. and Ferreira, H. (2013). First description of KPC-3 and IMP-type carbapenemase producing *Escherichia coli* in the hospital setting in the north of Portugal. ECCMID, 2013

Gonçalves, D., Cecílio, P., Branca, F., Iglésias, C., Faustino, A., Estrada, A. and Ferreira, H. (2013). Successful installation of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* producing IMP-22 in an acute care portuguese hospital. ECCMID, 2013

Gonçalves, D., Cecílio, P., Branca, F., Iglesias, C., Faustino, A., Alves, A., Veloso, I., Estrada, A. and Ferreira, H. (2013). Outbreak of CTX-M group 1 extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal special care unit in a portuguese hospital in the north of Portugal. ECCMID, 2013

Gonçalves, D., Branca, F., Iglésias, C., Faustino, A., Mota-Garcia, F., Estrada, A. and Ferreira, H. (2012). Detection of *bla*_{IMP-22} in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate in an acute care hospital in Portugal. *Clin Microbiol Infect*, 18, S3, 764

Gonçalves, D. and Ferreira, H. (2011). MDR *Acinetobacter baumannii* faecal colonization of nursing home residents of northern Portugal. *Clin Microbiol Infect*, 17, S2, 53

Gonçalves, D., Rodrigues, H. and Ferreira, H. (2010). Paediatric faecal colonization with extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* in northern Portugal. *Clin Microbiol Infect*, 16, S2, 354

Gonçalves, D. and Ferreira, H. (2009). Extended-Spectrum Beta-Lactamase producing *Enterobacteriaceae* in the faecal flora of Portuguese nursing home residents. *Clin Microbiol Infect*, 15, S4, 479

Agradecimentos

Apesar de serem poucas as palavras, deixo um sentido e profundo agradecimento a todos os que colaboraram na realização deste trabalho.

À Professora Doutora Helena Neto Ferreira de Sousa pelo apoio, disponibilidade, incentivo, estímulo, ajuda incansável, críticas e sugestões relevantes que pautaram a sua orientação. Obrigada por todo o carinho e compreensão ao longo destes anos.

Ao Departamento de Ciências Biológicas e Serviço de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, por ter disponibilizado materiais e equipamentos necessários à realização deste trabalho.

Ao Hospital de Braga por ter autorizado a realização deste trabalho no Serviço de Patologia Clínica e cedência dos isolados de *Enterobacteriaceae* multirresistentes aos antibióticos. Ao Dr Fernando Mota-Garcia que acreditou neste projecto e abriu as portas do Serviço de Patologia Clínica. À Dra Alexandra Estrada por toda a ajuda. Ao Laboratório de Microbiologia, nomeadamente à Dra Alberta Faustino e Dra Carmen Iglésias por toda a ajuda e apoio. Em muito particular, à Dra Alberta Faustino, pelo seu incansável apoio, ajuda e entusiasmo. Ao Dr Fernando Branca do Laboratório de Biologia Molecular pelo seu contributo e ajuda.

Às instituições de apoio social e de prestação de cuidados de saúde, profissionais e residentes, pela colaboração fundamental neste estudo e autorização da recolha das amostras.

Ao Pedro Cecílio pela valiosa ajuda, conhecimentos transmitidos e o incansável apoio em todos os momentos.

Ao grupo de investigação da Professora Doutora Luísa Peixe, em especial à Ângela Novais, Carla Rodrigues e João Pires pela disponibilidade e ajuda no procedimento de PFGE, utilização do programa InfoQuest e cedência de isolados de *Escherichia coli* com fins de controlo das reacções de PCR, para identificação de grupos filogenéticos de *Escherichia coli*.

Ao Laurent Poirel pela disponibilização do controlo de *Klebsiella pneumoniae* produtor de OXA-48.

Ao Serviço de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, nomeadamente à Professora Doutora Olga Cardoso e à Sónia pela ajuda em algumas técnicas.

À Cristina Pinto da Costa e Nuno Oliveira do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pela ajuda, disponibilidade e apoio.

Ao Instituto Superior de Saúde do Alto Ave pela ajuda e compreensão ao longo do trabalho.

À minha família, Cristina, Nuno, D. Maria e amigos pela amizade e apoio. Aos meus pais, pelo amor e compreensão, sempre presente.

Ao Ricardo pelo abraço amigo, compreensão e todo o amor. O último ano não foi fácil, mas nunca deixei de acreditar.

A fé e o amor caminham de mãos dadas.

*“o amor é paciente. O amor é benigno;
não é invejoso, não é altivo nem orgulhoso;
não é inconveniente, não procura o próprio interesse;
não se irrita, não guarda ressentimento;
não se alegra com a injustiça,
mas alegra-se com a verdade;
tudo desculpa, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.*

(I epístola do apóstolo São Paulo aos Coríntios)

Muito obrigada.

Resumo

O envelhecimento da população marca o século XXI a uma velocidade sem precedentes, ao qual a emergência e disseminação de *Enterobacteriaceae* multirresistentes aos antibióticos não parecem ser indiferentes. Em Portugal, a reorganização dos cuidados de saúde direccionou-se a este grupo da população, atendendo ao impacto do envelhecimento, patologias, situações de dependência e de fragilidade, com vista à criação de respostas intermédias, com menores custos, sediadas na comunidade, como é o caso dos lares de idosos e das UCCI.

A sinergia entre situações inerentes às condições fisiológicas e patológicas da população idosa e/ou debilitada, questões organizacionais das instituições centradas na proximidade dos residentes, com partilha de espaços comuns e contacto com diversos prestadores de cuidados, associado a possíveis falhas de controlo de infeção e à utilização de antibióticos, são fatores de risco importantes que contribuem para a emergência de *Enterobacteriaceae* multirresistentes aos antibióticos nas instituições de prestação de cuidados de saúde.

O objetivo do trabalho consistiu na avaliação da colonização fecal de residentes de instituições de apoio social e de prestação de cuidados de saúde e na deteção de possíveis relações de disseminação entre as diferentes respostas de cuidados de saúde à população idosa e/ou dependente na região norte de Portugal. Foram estudados isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de colonização fecal em lares de idosos e Unidades de Cuidados Continuados Integrados, incluindo a prestação de cuidados agudos a nível hospitalar através de isolados responsáveis por infeções, funcionando como modelo de disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases de espectro alargado (ESBLs) e/ou de carbapenemases numa zona geográfica definida.

Colonização fecal por *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBLs foi relevante em residentes de lares de idosos e de Unidades de Cuidados Continuados Integrados, o que parece estar relacionado com características inerentes ao tipo de prestação de cuidados de saúde. Os resultados demonstram a disseminação de isolados de *Escherichia coli* produtoras de CTX-M grupo 1 do grupo clonal pandémico e virulento O25b-ST131 resistente aos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas responsáveis por infeções em ambiente hospitalar e por colonização intestinal de residentes de instituições de prestação de cuidados de saúde extra-hospitalares, vocacionados à população idosa e/ou dependente. Os isolados de *Escherichia coli* apresentam

características de isolados extra-intestinais com características de multiresistência e potencial de virulência. Isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtora de associação de β -lactamases do tipo TEM, OXA e ESBL do tipo CTX-M grupo 1, do mesmo clone, foram detectados na colonização fecal na comunidade, em residentes de lares de idosos e de Unidades de Cuidados Continuados Integrados e na prestação de cuidados agudos e diferenciados, em unidade de cuidados de neonatologia e em diferentes serviços da unidade hospitalar, alertando para a disseminação destes isolados multirresistentes aos antibióticos nas diferentes tipologias de prestação de cuidados de saúde.

A instalação bem sucedida de *Klebsiella pneumoniae* produtora de IMP-22 no ambiente hospitalar, particularmente no serviço de medicina interna e como colonizadora fecal numa Unidade de Cuidados Continuados Integrados, é descrita pela primeira vez neste trabalho. KPC-3 é descrita pela primeira vez em isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* responsáveis por infeções na região norte do País, alertando para esta nova realidade.

A colonização intestinal representa uma forma silenciosa de disseminação de *Enterobacteriaceae* produtora de ESBL e de carbapenemases e de genes de resistência, favorecida pela mobilidade da população idosa e/ou dependente entre as diferentes instituições de prestação de cuidados de saúde. Os resultados da avaliação da relação de clonalidade de *Escherichia coli* produtora de CTX-M grupo 1 do grupo clonal O25b-ST131 e a deteção de *Klebsiella pneumoniae* produtora de IMP-22 como colonizadora intestinal, alertam para a importância da circulação deste grupo da população entre as diferentes tipologias de cuidados de saúde, favorecendo a disseminação destes isolados multirresistentes. A ecologia bacteriana típica da área de prestação de cuidados de saúde é influenciada pelas interações entre os vários tipos de cuidados, justificando a disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos que podem constituir uma ameaça em termos de Saúde Pública e contribuir para a instalação de surtos nestas instituições.

A vigilância contínua de *Enterobacteriaceae* multirresistentes aos antibióticos e a aplicação de medidas de controlo de infeção são essenciais nas unidades hospitalares e nas instituições de prestação de cuidados de saúde extra-hospitalares. O rastreio de colonização fecal para deteção de *Enterobacteriaceae* multirresistentes aos antibióticos neste grupo da população considerado de risco, na admissão nas diferentes tipologias de cuidados de saúde e na avaliação antes da alta, poderão ser importantes para limitar este ciclo de disseminação na rede de prestação de cuidados de saúde e na comunidade.

Palavras-chave: população idosa, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, ESBL, carbapenemases

Abstract

Population aging is a mark of the twenty-first century that is growing at an amazing rate, and to which the emergence and dissemination of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* does not seem to be indifferent. In Portugal, the reorganization of the health care services was directed to this group of the population with the creation of community based responses, given the impact of aging, pathologies, situations of dependence and fragility. Moreover, organizational issues of institutions centered on the proximity of residents, sharing common physical spaces and various care providers, associated with possible failures of infection control and misuse of antibiotics, can work in synergy with physiological and pathological conditions of the elderly and/or debilitated population contributing as risk factors for the emergence of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* in health care institutions.

The objective of this work, was to assess the faecal colonization of residents staying at social support and health care providing institutions in order to establish a relationship between the dissemination responses of distinct health care facilities for the elderly and/or dependent population, in northern Portugal. Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* were obtained from faecal colonization from Nursing Homes and Long Term Care Facilities, as well as, isolates responsible for infections of a Central Hospital in the same area. This might act as a dissemination model of extended spectrum β -lactamases (ESBLs) and/or carbapenemases producing *Enterobacteriaceae*, in a defined geographical area.

Fecal colonization by ESBL producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* was relevant in inpatients of Nursing Homes and Long Term Care Facilities, which seems to be related to the type of care provided by these facilities. The results showed the dissemination of isolates of *Escherichia coli* producing CTX-M group 1 from the pandemic virulent clonal group O25b-ST131, resistant to aminoglycosides and fluoroquinolones, which are responsible for infection and intestinal colonization of inpatients of the elderly and/or dependent population health care institutions. The isolates of *Escherichia coli* showed characteristics of extra-intestinal isolates with multiresistance and virulence potential. Isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing β -lactamases of TEM and OXA types, and ESBL of CTX-M group 1 of the same clone, were detected in fecal colonization of inpatients of Nursing Homes and Long Term Care Facilities and in the acute and specialized neonatal care unit and in different wards of the hospital, warning to the dissemination of multi-resistant isolates in different types of health care facilities.

The successful installation of IMP-22 producing *Klebsiella pneumoniae* in hospital, particularly in internal medicine ward, as well as, fecal colonization in a patient of a Long Term Care Facility is reported for the first time.

KPC-3 was detected for the first time in isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* responsible for infections in the northern region of the country.

Intestinal colonization is a silent form of dissemination of ESBL and carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* and resistance genes, promoted by the circulation of elderly and/or dependent patients between different institutions that provide health care to this population. The results of the evaluation of the clonality relationships of CTX-M group 1 producing *Escherichia coli* from the clonal group O25b-ST131 and the detection of IMP-22 producing *Klebsiella pneumoniae* as an intestinal colonizer raise an alert to the circulation of patients between different types of health care institutions, favoring the dissemination of these multi-resistant isolates. Health care typical bacterial ecology is influenced by the interrelationships between various types of care, justifying the dissemination of multi-resistant bacteria creating a public health threat and contributing to the installation of outbreaks in these institutions.

From the results, it can be concluded that a continuous surveillance of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* and implementation of infection control measures are essential in hospitals and in community health care institutions. Screening for detection of fecal colonization of multiresistant *Enterobacteriaceae* in this risk group, upon admission at different health care institutions and their evaluation before discharge, are important to limit the dissemination cycle in the network of health care facilities and community.

Keywords: elderly, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, ESBL, carbapenemase

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	29
1 – Alterações demográficas na sociedade actual e resistência aos antibióticos	30
1.1 – Prestação de cuidados de saúde direccionados à população idosa e dependente em Portugal.....	30
1.2 – Envelhecimento da população e resistência aos antibióticos	32
1.3 – Microbioma Intestinal.....	35
1.4 – <i>Enterobacteriaceae</i>	37
2 – <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de ESBLs e de carbapenemases	41
2.1 – Antibióticos β -lactâmicos.....	42
2.2 – β -lactamases.....	45
2.3 – β -lactamases de Espectro Alargado - ESBLs	49
2.4 – Carbapenemases	55
2.5 – Mecanismos de disseminação de <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de ESBLs e de carbapenemases	61
2.6 – Detecção laboratorial de β -lactamases de Espectro Alargado e de Carbapenemases	63
3 – <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>, das ESBLs às carbapenemases na prestação de cuidados de saúde.....	66
3.1 – Clone virulento de <i>Escherichia coli</i> produtora de CTX-M-15 do grupo clonal O25b-ST131 multirresistentes aos antibióticos	69
3.2 – Estratégias de Controlo de Infecção em instituições de prestação de cuidados de saúde à população idosa e/ou dependente	71
OBJETIVOS	73
MATERIAL E MÉTODOS.....	77
1 – Seleção de isolados de <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de ESBLs e isolados apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos provenientes de colonização fecal de utentes de instituições de prestação de cuidados de saúde na comunidade	78
1.1 – Caracterização das instituições de apoio social e prestação de cuidados de saúde	78
1.2 – Processamento das amostras de fezes.....	81
2 – Identificação dos isolados de <i>Escherichia coli</i> e de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtores de ESBLs e/ou apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos	82
2.1 – Determinação do fenótipo de resistência aos antibióticos em isolados de <i>Escherichia coli</i> e de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	82

3 – Isolados de <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de ESBLs e isolados apresentando redução da susceptibilidade aos carbapenemos responsáveis por infecções do Hospital de Braga.....	84
3.1 – Hospital de Braga	85
3.2 – Métodos automatizados de identificação e de determinação da suscetibilidade aos antibióticos.....	86
3.3 – Determinação da Concentração Mínima Inibitória por E-test para isolados produtores de β -lactamases de Espectro Alargado e de Metallo- β -Lactamases	88
4 – Caracterização de genes de resistência aos antibióticos β-lactâmicos e não β-lactâmicos	88
4.1 – Condições gerais das reações de amplificação de DNA por PCR	88
5 – Caracterização molecular de isolados de <i>Escherichia coli</i> produtores de β-lactamases de Espectro Alargado	93
5.1 – Identificação do grupo clonal O25b-ST131 por PCR.....	93
5.2 – Identificação do grupo filogenético dos isolados de <i>Escherichia coli</i> produtora de β -lactamases de Espectro Alargado	93
5.3 – Caracterização de genes que codificam fatores de virulência em isolados de <i>Escherichia coli</i> produtores de β -lactamases de Espectro Alargado	94
5.4 – Eletroforese em gel de agarose e visualização dos produtos de amplificação	98
5.5 – Sequenciação	98
5.6 – Transferência de genes de resistência por conjugação bacteriana	99
5.7 – Avaliação da relação de clonalidade dos isolados por Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)	100
RESULTADOS	103
1 – Seleção de isolados de <i>Enterobacteriaceae</i> produtores de ESBLs e apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos de colonização fecal e responsáveis por infecções	104
1.1 – Seleção de isolados de <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de ESBLs e apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos de residentes de lares de idosos e de Unidades de Cuidados Continuados Integrados	104
1.2 – Isolados de <i>Escherichia coli</i> e de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtores de ESBLs e/ou apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos responsáveis por infecções provenientes do Hospital de Braga.....	113
2 – Fenótipo de resistência aos antibióticos dos isolados de <i>Escherichia coli</i> e de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtores de ESBLs e/ou apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos.....	118

2.1 – Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos em isolados de <i>Escherichia coli</i> e de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtores de ESBLs provenientes de colonização fecal de residentes de lares de idosos	119
2.2 – Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos em isolados de <i>Escherichia coli</i> e de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtores de ESBLs provenientes de colonização fecal de residentes de UCCI	125
2.3 – Caracterização fenotípica da resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos dos isolados de <i>Escherichia coli</i> e de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtores de ESBLs responsáveis por infeções do hospital de Braga	133
3 – Caracterização molecular dos isolados de <i>Escherichia coli</i> produtores de ESBLs provenientes do estudo de colonização fecal e responsáveis por infeções do hospital de Braga	141
3.1 – Caracterização dos genes codificadores de β -lactamases em isolados de <i>Escherichia coli</i> provenientes do estudo de colonização fecal e responsáveis por infeções do hospital de Braga	141
3.2 – Caracterização dos genes codificadores de mecanismos de resistência aos antibióticos não β -lactâmicos em isolados de <i>Escherichia coli</i> produtores de ESBLs provenientes do estudo de colonização fecal e responsáveis por infeções do hospital de Braga	144
3.3 – Detecção do grupo filogenético nos isolados de <i>Escherichia coli</i> produtores de ESBLs	146
3.4 – Detecção do grupo clonal O25b-ST131 nos isolados de <i>Escherichia coli</i> produtores de ESBLs	147
3.5 – Caracterização dos fatores de virulência em isolados de <i>Escherichia coli</i> produtores de ESBLs	147
3.6 – Estudo das relações clonais de isolados de <i>Escherichia coli</i> produtores de ESBLs do estudo de colonização fecal e responsáveis por infeções do hospital de Braga	159
4 – Caracterização molecular de isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> do estudo de colonização fecal e responsáveis por infeções do hospital de Braga	165
4.1 – Caracterização de isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de ESBL provenientes da Unidade de Cuidados Especiais de Neonatologia do Hospital de Braga	170
4.2 – Estudo das relações clonais de isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtores de ESBLs do estudo de colonização fecal e responsáveis por infeções do hospital de Braga	173
5 – Caracterização dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> e de <i>Escherichia coli</i> com redução da suscetibilidade aos carbapenemos do estudo de colonização fecal e responsáveis por infeções do hospital de Braga	177
5.1 – Caracterização dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos provenientes do estudo de colonização fecal	177
5.2 – Caracterização dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> e de <i>Escherichia coli</i> com redução da suscetibilidade aos carbapenemos do Hospital de Braga	180

DISCUSSÃO	189
CONCLUSÕES	225
PERSPETIVAS FUTURAS	229
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	233
ANEXOS	270

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos em diferentes nichos e consequente transmissão ao Homem	33
Figura 2 - Impacto da administração de antibióticos na flora bacteriana intestinal ao longo do tempo	36
Figura 3 - Principais fatores de Virulência de isolados de <i>Escherichia coli</i> uropatogénicos	40
Figura 4 - Locais de ação dos principais grupos de antibióticos β -lactâmicos e não- β -lactâmicos em bactérias de Gram negativo e respectivos mecanismos de resistência aos antibióticos.....	42
Figura 5 - Estrutura química representativa dos quatro grupos de antibióticos β -lactâmicos.....	43
Figura 6 - Estrutura da parede celular de bactérias de Gram negativo e local de ação dos antibióticos β -lactâmicos.....	43
Figura 7 - Relação filogenética da família das β -lactamases do tipo CTX-M.....	52
Figura 8 - Distribuição mundial de β -lactamases do tipo CTX-M	54
Figura 9 - Distribuição de <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de carbapenemases no Mundo e na Europa	56
Figura 10 - Elementos genéticos de aquisição e de transferência de genes de resistência aos antibióticos	62
Figura 11 - Evolução temporal da utilização de diferentes classes de antibióticos β -lactâmicos na clínica e aparecimento de β -lactamases em <i>Enterobacteriaceae</i>	67
Figura 12 - Localização do Hospital de Braga (HB) e instituições de prestação de cuidados de saúde na comunidade, lares de idosos (LI) e UCCI (UC), do distrito de Braga e Porto.....	86
Figura 13 - Colonização fecal por <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de ESBLs e/ou apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos em residentes de lares de idosos e UCCI do distrito de Braga e do Porto.....	107
Figura 14 - Espécies da família <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de ESBLs e/ou com redução da suscetibilidade aos carbapenemos detetadas como colonizadoras fecais em residentes de lares de idosos e de UCCI da região norte de Portugal	109

Figura 15 - Isolados de <i>Escherichia coli</i> e de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de ESBLs e apresentando redução da sustentabilidade aos carbapenemos detetados no estudo de colonização fecal.....	111
Figura 16 - Isolados de <i>Escherichia coli</i> e de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtores de ESBLs responsáveis por infeções de doentes do hospital de Braga.....	114
Figura 17 - Isolados de <i>Escherichia coli</i> produtora de ESBL responsáveis por infeções provenientes de doentes do hospital de Braga, distribuídos por serviços e produtos biológicos	115
Figura 18 - Isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de ESBL responsáveis por infeções provenientes de doentes do hospital de Braga, distribuídos por serviços e produtos biológicos	115
Figura 19 - <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos responsáveis por infeções de doentes do hospital de Braga	117
Figura 20 - Distribuição dos genes codificadores de β -lactamases nos isolados de <i>Escherichia coli</i> produtores de ESBLs do estudo de colonização fecal e de isolados responsáveis por infeções do hospital de Braga	142
Figura 21 - Distribuição da resistência aos antibióticos não β -lactâmicos em isolados de <i>Escherichia coli</i> produtores de ESBLs	144
Figura 22 - Distribuição de genes codificadores de resistência aos antibióticos não β -lactâmicos em isolados de <i>Escherichia coli</i> produtores de ESBLs.....	146
Figura 23 - Distribuição dos genes de virulência detetados nos isolados de <i>Escherichia coli</i> produtores de ESBLs do estudo de colonização fecal e isolados responsáveis por infeções do Hospital de Braga.....	148
Figura 24 - Relação clonal e resumo dos resultados dos isolados de <i>Escherichia coli</i> do estudo de colonização fecal realizado a utentes de lares de idosos e de UCCI, e isolados de infeções do hospital de Braga.....	163
Figura 25 - Distribuição dos genótipos de β -lactamases detetadas nos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> do estudo de colonização fecal e responsáveis por infeções do hospital de Braga..	166
Figura 26 - Relação clonal e resumo dos resultados dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> do estudo de colonização fecal realizado a utentes de lares de idosos e de UCCI, e isolados de infeções do hospital de Braga.....	176
Figura 27 - Relação clonal dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtores de IMP-22 do hospital de Braga.....	185

Figura 28 - Detecção de relações geográficas dos isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs e de Carbapenemases em diferentes instituições de prestação de cuidados de saúde na região norte de Portugal.219

Figura 29 - Evolução temporal do aparecimento de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBLs e Carbapenemases em isolados comensais e responsáveis por infeções na região norte de Portugal222

Referências das imagens utilizadas na capa:

Imagem 1 - CDC, 2013; Imagem 2 - Jernbergh *et al*, 2010; Imagens 3, 4 e 5 - resultados deste trabalho.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das β -lactamases segundo Ambler e Bush-Jacoby-Medeiros.....	47
Tabela 2 - Sequência nucleotídica dos <i>primers</i> utilizados nas reacções de PCR e de sequenciação	91
Tabela 3 - Sequência nucleotídica dos primers utilizados nas reacções de amplificação para detecção de genes codificadores de fatores de virulência	95
Tabela 4 - Distribuição do número de isolados de <i>Enterobacteriaceae</i> produtores de ESBLs e apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos em residentes de lares de idosos e de UCCI do distrito de Braga e do Porto.....	106
Tabela 5 - Distribuição dos isolados de <i>Escherichia coli</i> e de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtores de ESBL responsáveis por infeções por sexo, idade e proveniência, na admissão no hospital de Braga	116
Tabela 6 - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos de isolados de <i>Escherichia coli</i> provenientes do estudo de colonização fecal no lar de idosos 5	121
Tabela 7 - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos de isolados de <i>Escherichia coli</i> provenientes do estudo de colonização fecal no lar de idosos 6	123
Tabela 8 - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos de isolados de <i>Escherichia coli</i> e de <i>Klebsiella pneumoniae</i> provenientes do estudo de colonização fecal no lar de idosos 7	124
Tabela 9 - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos de isolados de <i>Escherichia coli</i> e de <i>Klebsiella pneumoniae</i> provenientes do estudo de colonização fecal na UCCI 1	127
Tabela 10 - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos de isolados de <i>Escherichia coli</i> provenientes do estudo de colonização fecal na UCCI 2	129
Tabela 11 - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos de isolados de <i>Escherichia coli</i> e de <i>Klebsiella pneumoniae</i> provenientes do estudo de colonização fecal na UCCI 3.....	130

Tabela 12 - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos dos isolados de <i>Escherichia coli</i> produtores de ESBLs responsáveis por infeções do Hospital de Braga.....	134
Tabela 13 - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtores de ESBLs responsáveis por infeções do Hospital de Braga	139
Tabela 14 - Caracterização molecular e relações clonais de isolados de <i>Escherichia coli</i> produtores de ESBLs provenientes de residentes de lares de idosos e de UCCI	149
Tabela 15 - Caracterização molecular e relações clonais de isolados de <i>Escherichia coli</i> produtores de ESBLs responsáveis por infeções do Hospital de Braga	155
Tabela 16 - Caracterização molecular dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de ESBL do estudo de colonização fecal em utentes de lares de idosos e de UCCI.....	167
Tabela 17 - Caracterização molecular dos isolados responsáveis por infeções de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de ESBL do hospital de Braga.....	168
Tabela 18 - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtores de ESBLs da Unidade Especial de Cuidados de Neonatologia do Hospital de Braga.....	171
Tabela 19 - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos e genes codificadores de β -lactamases dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos como colonizadores fecais de utentes do lar de idosos 7 e de doentes da UCCI 3	179
Tabela 20 - Caracterização dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> e de <i>Escherichia coli</i> com redução da suscetibilidade aos carbapenemos do hospital de Braga.....	182

Lista de Abreviaturas e Símbolos

% - Percentagem

AK - Amicacina

AM - Ampicilina

AMC - Amoxicilina com ácido clavulânico

ATCC - American Type Culture Collection

ATM - Aztreonamo

AVC - Acidente vascular cerebral

AVDs - Atividades de vida diária

BHI - Brain Heart Infusion

CAZ - Ceftazidima

CF - Cefalotina

CIP - Ciprofloxacina

CLED - Cistina-Lactose Electrólito Deficiente

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI - Concentração mínima inibitória

CN - Gentamicina

CS - Colistina

CT/CTL - Cefotaxima (CT) e Cefotaxima com ácido clavulânico (CTL)

CTX - Cefotaxima

CVP - Cateter Venoso Periférico

CXM - Cefuroxima

DNA - Ácido Desoxirribonucleíco

dNTP's - Desoxirribonucleotídeos

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

ESBL - Extended spectrum β -lactamase

E-test - Epsilon-test

ETP - Ertapenemo

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

F - Nitrofurantoína

FEP - Cefepime

h - Horas

HTA - Hipertensão arterial

I - Sensibilidade intermédia

IACS - Infecção Associada aos Cuidados de Saúde
IP/IPI - Imipenemo (IP) e imipenemo com EDTA (IPI)
IPM - Imipenemo
IPSS - Instituição Particular de Solidariedade Social
ITU - Infecção do Trato Urinário
KPC – *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
LVX - Levofloxacina
MBLs - Metallo- β -lactamases
MEM - Meropenemo
MFR - Medicina Física e de Reabilitação
 $MgCl_2$ - Cloreto de Magnésio
MH - Müller-Hinton
ml - Mililitro
mm - Milímetro
MNO - Minociclina
NAG - N-acetilglucosamina
NAM - N-acetilmurâmico
OMP - Outer Membrane Proteins
OXA - Oxacilinase
PAI - Pathogenicity Island
pb - pares de bases
PBP - Penicillin Binding Protein
PCR - Polymerase Chain Reaction
PEF - Pefloxacina
PFGE - Pulsed-Field Gel Electrophoresis
PIP - Piperacilina
PM/PML - Cefepime (PM) e cefepime com ácido clavulânico (PML)
R - Resistente
RNA - Ácido Ribonucleico
RNCCI - Rede Nacional de Cuidados Continuados Integrados
rpm - Rotações por minuto
S - Sensível
SI - Sequência de Inserção
SNG - Sonda nasogátrica
ST - Sequence type
T/S - Trimetoprim-sulfametoxazol

TI - Ticarcilina

TIC - Ticarcilina-ácido clavulânico

TOb - Tobramicina

TSB - Trypticase Soy Broth

TZ/TZL - Ceftazidima (TZ) e ceftazidima com ácido clavulânico (TZL)

TZP - Piperacilina-tazobactam

UCCI - Unidade de Cuidados Continuados Integrados

UCIP - Unidade de Cuidados Intensivos Polivalente

UFC/mL - Unidade Formadora de colónia por mililitro

ULDM - Unidade de Longa Duração e Manutenção

UMDR - Unidade de Média Duração e Reabilitação

V - Volt

µl - Microlitro

INTRODUÇÃO

1 – Alterações demográficas na sociedade actual e resistência aos antibióticos

O envelhecimento da população é um fenómeno universal do século XXI, marcado pelo aumento da população com mais de 65 anos e redução da população jovem. As principais causas do envelhecimento residem na diminuição da taxa de mortalidade, aumento da esperança média de vida e declínio da fecundidade (Carneiro *et al*, 2012). Na Europa, o envelhecimento da população é preocupante, que tem vindo a aumentar de forma considerável nos últimos anos. Em Portugal registou-se no ano de 2011 cerca de 19% da população com mais de 65 anos (Censos, 2011).

A transição demográfica da população, sentida nos últimos anos, apresenta repercussões na sociedade, particularmente no sector da saúde. O aumento progressivo da população idosa condicionou o aumento das situações de dependência e de doenças crónicas, um dado incontornável com implicações significativas no sector da saúde e do apoio social, que condicionaram os cuidados de saúde e as respostas de apoio social na comunidade (McClean *et al*, 2011; Carneiro *et al*, 2012; Heudorf *et al*, 2012; Suetens, 2012). Novas dinâmicas e respostas de apoio social e de cuidados de saúde surgiram com a proliferação de inúmeras instituições e entidades públicas e privadas vocacionadas aos cuidados geriátricos (Carneiro *et al*, 2012). A criação de respostas nos sectores da saúde e serviços sociais de encontro às necessidades deste segmento da população teve impacto significativo no crescimento do sector económico na Europa (Carneiro *et al*, 2012).

1.1 – Prestação de cuidados de saúde direccionados à população idosa e dependente em Portugal

O aumento do envelhecimento da população, optimização de custos dos cuidados de saúde nas unidades hospitalares com resultados ao nível da redução do tempo de internamento, altas hospitalares precoces (Suetens, 2012) e mudança do perfil das famílias, determinou novas realidades na prestação de cuidados de saúde na comunidade (Abreu Nogueira, 2009). Em Portugal, as novas respostas de cuidados de saúde posicionam-se entre os cuidados de saúde primários e os cuidados hospitalares (Abreu Nogueira, 2009). As novas políticas sociais e de saúde direccionadas para a terceira idade caracterizam-se pela existência de serviços de apoio social e cuidados de

saúde, como sendo os tradicionais lares de idosos, centros de dia, serviço de apoio domiciliário, residências séniores, Unidades de Cuidados Continuados Integrados (UCCI) e recentemente as *aldeias-lares* (Carneiro *et al*, 2012). Neste contexto é de salientar o papel das instituições de solidariedade social, sendo exemplo as instituições da Santa Casa da Misericórdia, Instituições Particulares de Solidariedade Social (IPSS) e Centros Sociais e Paroquiais com papel fundamental na intervenção social neste segmento da população (Carneiro *et al*, 2012; Suetens, 2012). Nestas instituições é promovido o apoio social e cuidados de saúde à população, que caracterizam-se pela proximidade.

A Rede Nacional de Cuidados Continuados e Integrados (RNCCI) surgiu como resposta no âmbito social e de cuidados de saúde a este segmento da população portuguesa, mais vulnerável. A RNCCI, formada por entidades públicas e privadas, destina-se à promoção da continuidade dos cuidados de saúde e apoio social adaptadas às necessidades dos utentes, independentemente da idade, que se encontrem em situação de dependência temporária ou prolongada (Ministério da Saúde e da Solidariedade Social, 2009; Carneiro *et al*, 2012). As respostas da RNCCI são dirigidas às necessidades da população no que respeita às situações de dependência funcional transitória decorrente do processo de convalescença ou outro; dependência funcional prolongada; idosos com critérios de fragilidade; incapacidade grave, com forte impacto psicossocial; doença severa, em fase avançada e terminal. As Unidades de Convalescença destinam-se a internamentos até 30 dias consecutivos. As Unidades de Média Duração e Reabilitação têm por finalidade a estabilização clínica, avaliação e reabilitação integral da pessoa, e compreendem internamentos superiores a 30 dias e inferiores a 90 dias consecutivos. As Unidades de Longa Duração e Manutenção proporcionam cuidados que previnam e retardem o agravamento de situações de dependência, proporcionando qualidade de vida, num período superior a 90 dias consecutivos. As Unidades de Cuidados Paliativos asseguram o acompanhamento, tratamento e supervisão em situação clínica complexa e de sofrimento, decorrentes de doença severa e/ou avançada, incurável ou progressiva (Ministério da Saúde e da Solidariedade Social, 2009).

Os cuidados de saúde prestados por familiares no domicílio, continuam a representar o pilar da prestação de cuidados de saúde em Portugal, a este grupo considerável da população (Carneiro *et al*, 2012). Apesar da institucionalização dos mais idosos e dependentes ser ainda uma realidade em muitos países na Europa, para assegurar a prestação de cuidados de saúde. A actual tendência nos países da União Europeia consiste no reforço dos cuidados no domicílio, com formação adequada dos cuidadores informais, familiares ou outros, e equipas de apoio domiciliário (Carneiro *et al*,

2012). Os cuidados no domicílio privilegiam a permanência, o maior número de anos possível, deste grupo da população em situações de desinstitucionalização e num modelo de cuidados que se baseiam no individual e personalizado, muito significativos em Portugal (Carneiro *et al*, 2012).

1.2 – Envelhecimento da população e resistência aos antibióticos

A utilização dos antibióticos em medicina humana, medicina veterinária, agricultura e pecuária contribuiu para o aparecimento de bactérias resistentes aos antibióticos que tem vindo a aumentar de forma alarmante em todo o Mundo (Gould, 2009; Allen *et al*, 2010; Davies *and* Davies, 2010; Andersson *and* Hughes, 2012; Carlet, 2012; Schmieder *and* Edwards, 2012; Theuretzbacher, 2011; Rodríguez-Rojas *et al*, 2013; Rolain, 2013). A utilização dos antibióticos no tratamento de infeções humanas e noutras áreas condicionou o aparecimento de bactérias resistentes aos antibióticos que constitui um importante problema de saúde pública, com o resultado inevitável da capacidade adaptativa bacteriana à pressão selectiva da utilização dos antibióticos, em muitas situações indiscriminada, e na sua disseminação. O ambiente, alimentos, animais e o Homem, representam importantes reservatórios de bactérias resistentes aos antibióticos (Baquero *et al*, 2008; Hunter *et al*, 2010; da Silva *and* Mendonça, 2012; da Costa *et al*, 2013; Finley *et al*, 2013; Rolain, 2013). O ciclo de disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos, como é exemplo de *Enterobacteriaceae* multirresistentes aos antibióticos é complexo e dinâmico (Figura 1).

A população idosa e/ou dependente, devido a maior vulnerabilidade apresentam maior predisposição para o desenvolvimento de infeções e estão mais sujeitas a internamentos em unidades hospitalares, devido a situações de agudização, diagnóstico e/ou tratamento especializado (Marchaim *et al*, 2013). Infeção do trato urinário, pele, tecidos moles e infeção gastrointestinal, representam as principais infeções neste grupo da população institucionalizada em unidades de prestação de cuidados de saúde na comunidade (Esposito *et al*, 2007) podendo resultar em complicações graves, internamento em unidades hospitalares e em algumas das situações, morte (McClean *et al*, 2011; Suetens, 2012; Lautenbach, 2013).

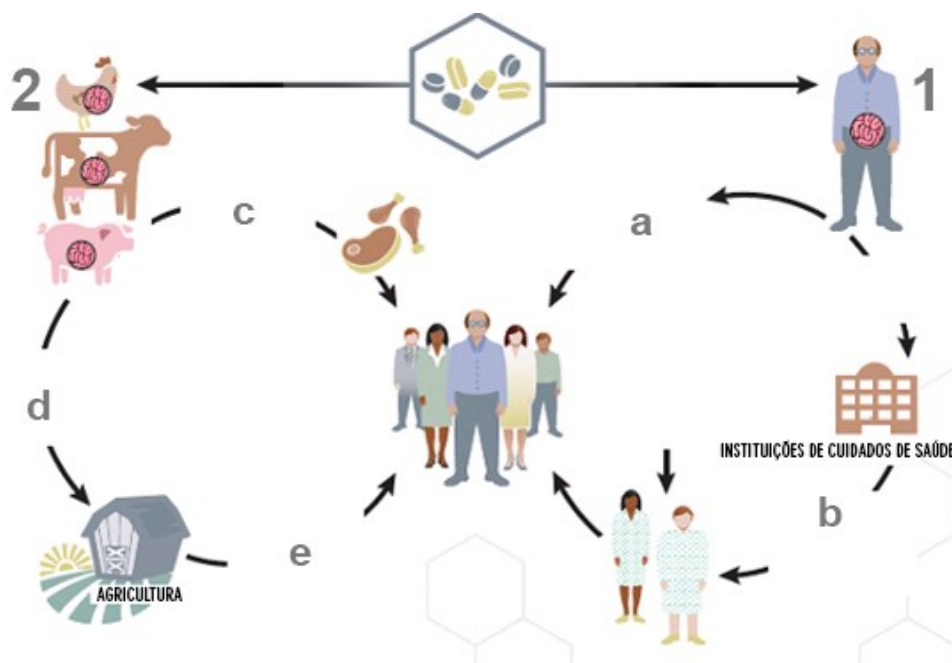


Figura 1 - Disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos em diferentes nichos e consequente transmissão ao Homem (*adaptado* de CDC, 2013).

Legenda: 1 - desenvolvimento de bactérias resistentes aos antibióticos na flora intestinal humana como consequência da utilização de antibióticos; a - disseminação familiar e na comunidade de bactérias resistentes aos antibióticos, b - disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos na prestação de cuidados de saúde hospitalares, lares de idosos e UCCI a outros residentes das instituições de prestação de cuidados de saúde através das mãos, profissionais e superfícies; 2 - desenvolvimento de bactérias resistentes aos antibióticos na flora intestinal animal como consequência da utilização de antibióticos, c - disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos ao Homem através dos alimentos, d - resíduos e água contendo fezes de animais com bactérias resistentes aos antibióticos podem ser utilizados na agricultura para produção de vegetais, e - transmissão de bactérias resistentes aos antibióticos que podem permanecer na flora intestinal do Homem através dos vegetais.

Bactérias resistentes aos antibióticos têm vindo a aumentar de forma significativa na comunidade, deixando de estar confinadas aos cuidados de saúde hospitalares, como reflexo da circulação de doentes entre as diferentes tipologias de cuidados de saúde e comunidade. Os cuidados de saúde apresentam um papel fundamental como reservatório e no aparecimento e disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos, que assumem cada vez maior importância como indicadores negativos de qualidade das instituições de prestação de cuidados de saúde (Woodford *et al*, 2011). Infecções por bactérias resistentes aos antibióticos em instituições de prestação de cuidados de saúde representam as principais causas do aumento de mortalidade e morbilidade, diminuição da qualidade de vida, aumento dos custos de saúde e cuidados médicos decorrentes da

redução de opções terapêuticas eficazes, internamentos prolongados em unidades hospitalares e re-emergência de doenças infecciosas (Dryden *et al*, 2011; Theuretzbacher, 2011; Carlet, 2012; CDC, 2013; Wellington *et al*, 2013).

Os cuidados de saúde vocacionados à população idosa e/ou dependente têm sido descritos como importantes no aparecimento e disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos como é exemplo de *Enterobacteriaceae* multirresistentes aos antibióticos associadas a clones virulentos e multirresistentes aos antibióticos (Theuretzbacher, 2011; Andersson *and* Hughes, 2012; Banerjee *and* Johnson, 2013). Residentes de instituições de prestação de cuidados de saúde na comunidade e doentes internados em unidades hospitalares apresentam risco elevado de colonização e de infeção por bactérias multirresistentes aos antibióticos devido à idade, vulnerabilidade e co-morbilidades associadas (Gruber *et al*, 2013). Colonização intestinal de residentes destas instituições de prestação de cuidados de saúde, maioritariamente idosos e dependentes, por bactérias resistentes aos antibióticos representam uma via de disseminação, com introdução e re-introdução, nos cuidados de saúde agudos e diferenciados, a outras instituições de cuidados de saúde e na comunidade (Stuart *et al*, 2011; Gruber *et al*, 2013). Esta situação apresenta impacto sócio-económico relevante devido ao fato de as infeções por bactérias multirresistentes aos antibióticos estarem associadas a taxas de mortalidade, morbilidade e custos de saúde associados, elevados (Gruber *et al*, 2013).

Procedimentos invasivos de diagnóstico e terapêutica, utilização de antibióticos e internamentos consecutivos, representam fatores de risco inerentes às instituições de prestação de cuidados de saúde à população idosa e/ou dependente que contribuem para o desenvolvimento de infeções por bactérias resistentes aos antibióticos. O ambiente das instituições de prestação de cuidados de saúde existentes na comunidade e os cuidados hospitalares, aumentam o risco de aquisição e disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos. A idade avançada, associada à debilidade do sistema imunitário, doenças crónicas, proximidade entre residentes da mesma instituição, com utilização de zonas de convívio comuns, internamentos prolongados, contacto frequente com profissionais de saúde e mobilização entre diferentes tipologias de cuidados de saúde, são fatores de risco identificados em instituições da comunidade relacionadas com a aquisição e desenvolvimento de infeção por bactérias resistentes aos antibióticos (McClean *et al*, 2011; Suetens, 2012; CDC, 2013; Lautenbach, 2013).

1.3 – Microbioma Intestinal

O microbioma intestinal tem sido referido como um importante reservatório de bactérias e genes de resistência aos antibióticos, com papel fundamental no desenvolvimento de doenças, como doença intestinal inflamatória, obesidade e desnutrição (Schjørring *and* Krogfelt, 2011; Baquero *and* Nombela, 2012). O trato intestinal é um ecossistema complexo e diversificado, composto por cerca de 1150 espécies bacterianas diferentes segundo abordagens de metagenómica (Schjørring *and* Krogfelt, 2011; Rolain, 2013), maioritariamente bactérias anaeróbias, que contribui de forma significativa para a manutenção do estado de saúde e equilíbrio do hospedeiro (Guarner *and* Malagelada, 2003; Jernberg *et al*, 2010; Baquero *and* Nombela, 2012; Clemente *et al*, 2012; Ladirat *et al*, 2013; Ruppé *and* Andremont, 2013; Robinson *et al*, 2010). A relação de simbiose entre a flora intestinal e o hospedeiro apresenta vantagens como proteção, produção de vitaminas, fornecimento de energia, desenvolvimento do sistema imunitário e integridade do tecido intestinal (Flint *et al*, 2010; Schjørring *and* Krogfelt, 2011; Clemente *et al*, 2012; Lawley *and* Walker, 2013; Ruppé *and* Andremont, 2013).

A composição e densidade bacteriana são variáveis ao longo do trato gastrointestinal, apresentando 10^4 bactérias/ml no estômago e 10^{12} bactérias/g de fezes na parte distal do colón, onde verifica-se maior diversidade (Schjørring *and* Krogfelt, 2011; Ruppé *and* Andremont, 2013; Robinson *et al*, 2010). A flora intestinal pode permanecer estável durante longos períodos, no entanto fatores externos como alimentação, água, idade, proveniência geográfica, consumo de antibióticos e probióticos são responsáveis pela alteração da composição da flora intestinal justificando a complexidade e diversidade (Jernberg *et al*, 2010; de Lastours *et al*, 2010; Baquero, 2012; Ladirat *et al*, 2013; Tosh *and* McDonald, 2012; Rolain, 2013).

Durante tratamento com antibióticos bactérias da flora intestinal são expostas à pressão selectiva exercida pelo consumo (Schjørring *and* Krogfelt, 2011), mesmo durante períodos de tempo pequenos, que induz de forma silenciosa alterações na composição da flora intestinal, com diminuição da diversidade bacteriana e de bactérias susceptíveis aos antibióticos, crescimento e predomínio de bactérias resistentes aos antibióticos (Figura 2) (Donskey, 2006; Jernberg *et al*, 2010; Schjørring *and* Krogfelt, 2011; Carlet, 2012; Garmendia *et al*, 2012; Tzouveleakis *et al*, 2012; Ruppé *and* Andremont, 2013; Rolain, 2013).

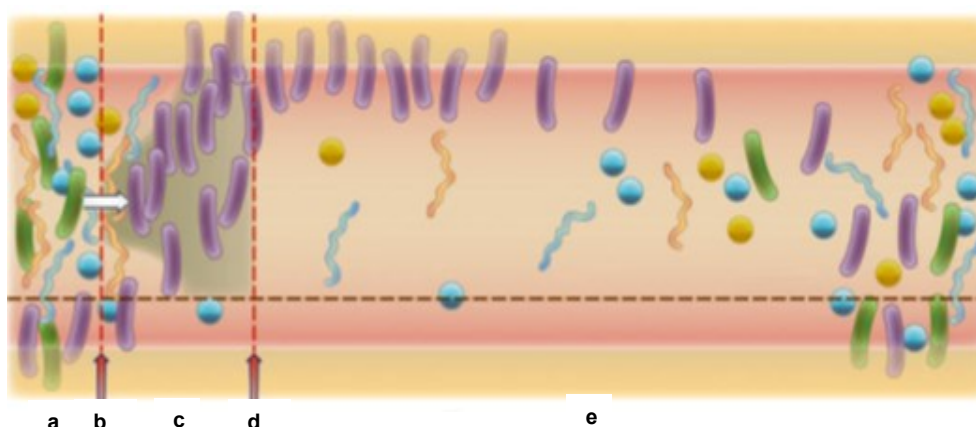


Figura 2 - Impacto da administração de antibióticos na flora bacteriana intestinal ao longo do tempo (adaptado de Jernberg *et al*, 2010).

Legenda: a - flora bacteriana diversa com predomínio de bactérias suscetíveis aos antibióticos (cor verde) antes do tratamento com antibióticos, b - tratamento com antibiótico, c - aumento significativo de bactérias resistentes aos antibióticos (cor violeta) como consequência da pressão seletiva exercida pelo consumo de antibióticos, na flora intestinal, d - fim do tratamento com antibiótico, e - redução de bactérias resistentes aos antibióticos ao longo do tempo e estabilização da flora bacteriana intestinal

A alteração da composição bacteriana da flora intestinal pelo consumo de antibióticos depende do espectro de ação do mesmo, dosagem (Ladirat *et al*, 2013), duração do tratamento, via de administração e propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas (Jernberg *et al*, 2010; Ruppé and Andremont, 2013). Bactérias resistentes aos antibióticos podem permanecer na flora intestinal, durante meses, de forma assintomática, representando maior risco de desenvolvimento de infecção, particularmente em doentes clinicamente vulneráveis (Flint *et al*, 2010; Jernberg *et al*, 2010; Schjørring and Krogfelt, 2011; Carlet, 2012; Lawley and Walker, 2013; Ruppé and Andremont, 2013).

O trato intestinal humano é um importante reservatório de bactérias resistentes aos antibióticos e espaço de intercâmbio de genes de resistência aos antibióticos através de elementos genéticos móveis e transferência horizontal de genes entre bactérias comensais e patogênicas (Salysers *et al*, 2004; Donskey, 2006; Marshall *et al*, 2009; Sommer *et al*, 2010; Allen *et al*, 2010; de Lastours *et al*, 2010; Schjørring and Krogfelt, 2011; Garmendia *et al*, 2012; Tosh and McDonald, 2012; Rolain, 2013; Ruppé and Andremont, 2013). O trato intestinal humano é assim considerado um local emergente de bactérias resistentes aos antibióticos, como é exemplo o de bacilos de Gram negativo resistentes aos antibióticos incluindo espécies da família das *Enterobacteriaceae*,

Pseudomonas aeruginosa e *Acinetobacter baumannii* e de genes de resistência aos antibióticos (Donskey, 2006; Schjørring and Krogfelt, 2011).

A colonização intestinal por *Enterobacteriaceae* produtoras de β -Lactamases de Espectro Alargado (ESBLs) ou de carbapenemases em doentes institucionalizados em unidades de cuidados de saúde (Schjørring and Krogfelt, 2011) pode preceder o início de infecção, como infecção do trato urinário e bacteriemia (Donskey, 2006; D'Andrea *et al*, 2013; Ruppé and Andremont, 2013) e possível disseminação destes bacilos de Gram negativo multirresistentes aos antibióticos a doentes institucionalizados e comunidade (Figura 1) (Carlet, 2012; D'Andrea *et al*, 2013). Em situações de alta dos cuidados hospitalares os pacientes podem estar colonizados por estes bacilos de Gram negativo multirresistentes aos antibióticos e contribuir para a disseminação extra-hospitalar a doentes institucionalizados em unidades de prestação de cuidados de saúde existentes na comunidade e à própria comunidade (Arpin *et al*, 2003). A situação inversa também poderá acontecer, permitindo a introdução de bacilos de Gram negativo resistentes aos antibióticos nos cuidados hospitalares (Arpin *et al*, 2003; March *et al*, 2009; Hilty *et al*, 2012).

1.4 – *Enterobacteriaceae*

Enterobacteriaceae é uma família heterogênea de bacilos de Gram negativo ubíquos em diferentes nichos como solo, plantas e água, e colonizadores do trato intestinal do Homem e animais (Denton, 2007; Nordmann *et al*, 2011; Seiffert *et al*, 2013). Representam a principal causa de infecção nos cuidados de saúde hospitalares e na comunidade e a emergência da multirresistência aos antibióticos apresenta impacto significativo nas taxas de mortalidade, morbidade e custos de saúde. Os antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos como fluoroquinolonas são os mais utilizados no tratamento de infecções por *Enterobacteriaceae* (Pitout, 2008).

Escherichia coli e *Klebsiella pneumoniae* são espécies desta família com maior relevância clínica, frequentemente associadas a infecções em unidades hospitalares e na comunidade que têm vindo a aumentar a resistência aos antibióticos, particularmente devido à produção de ESBLs e carbapenemases (Paterson, 2005; Pitout, 2009; Nordmann *et al*, 2011a; Vaux *et al*, 2011; Seiffert *et al*, 2013).

1.4.1 – *Escherichia coli*

Escherichia coli é um importante colonizador do trato intestinal do Homem e de vários animais utilizada como indicador de contaminação fecal na avaliação da qualidade das águas e alimentos (Johnson *and* Stell, 2000; Moriel *et al*, 2012; Pitout, 2012; Mainil, 2013; Ruppé *and* Andreumont, 2013). Este anaeróbio facultativo de maior relevância clínica da família *Enterobacteriaceae* está associado a infecções em instituições de prestação de cuidados de saúde e na comunidade, como infecção do trato urinário, bacteriemia, pneumonia nosocomial, colecistite, colangite, peritonite, celulite, osteomielite, artrite e meningite neonatal (Rodríguez-Baño *et al*, 2008; Rogers *et al*, 2011; Gilbreel *et al*, 2012; Pitout, 2012; Lautenbach, 2013; Mainil, 2013; Seiffert *et al*, 2013; Theuretzbacher, 2011; Ruppé *et al*, 2013).

Existem diferentes tipos patogénicos de *Escherichia coli* que apresentam capacidade de desenvolver infecções no sistema gastrointestinal, referidas como *Escherichia coli* intestinal. Outros tipos patogénicos de *Escherichia coli* são responsáveis pelo desenvolvimento de infecções extra-intestinais, referidas como *Escherichia coli* extra-intestinal (ExPEC) (Stenutz *et al*, 2006; Pitout, 2012d). *Escherichia coli* extra-intestinal inclui diferentes patótipos nomeadamente *Escherichia coli* uropatogénica, *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Escherichia coli* enteroinvasiva, *Escherichia coli* enterohemorrágica e *Escherichia coli* enteroagregativa (Stenutz *et al*, 2006; Pitout, 2012d; Spurbeck *et al*, 2012).

A estrutura clonal de *Escherichia coli* é determinada pela presença de antígenos, nomeadamente antígeno somático (antígeno O), capsular (antígeno K) e flagelar (antígeno H) (Stenutz *et al*, 2006; Tenaillon *et al*, 2010; DebRoy *et al*, 2011). A análise filogenética de *Escherichia coli* permite diferenciar isolados intestinais de isolados extra-intestinais pela associação a quatro grupos filogenéticos: A, B1, B2 e D. Isolados de *Escherichia coli* patogénicos e virulentos responsáveis por infecções extra-intestinais pertencem normalmente ao grupo filogenético B2, e em menor frequência, ao grupo D, enquanto isolados comensais intestinais de *Escherichia coli* pertencem normalmente aos grupos filogenéticos A e B1 (Clermont *et al*, 2000; Johnson *and* Stell, 2000; Pitout, 2012). Estes isolados de *Escherichia coli* colonizam de forma assintomática o trato intestinal, no entanto são também responsáveis por diversas infecções como infecções do trato urinário, septicemia e meningite neonatal (Köhler *and* Dobrindt, 2011).

Escherichia coli extra-intestinal, nomeadamente *Escherichia coli* uropatogénica é comum em infecções extra-intestinais, como infecções do trato urinário (Stenutz *et al*, 2006; Nielubowicz *and* Mobley, 2010; Köhler *and* Dobrindt, 2011; Spurbeck *et al*, 2012;

Lautenbach, 2013; Totsika *et al*, 2011) e em infecções sistêmicas (köhler *and* Dobrindt, 2011; Pitout, 2012d). Fatores de virulência permitem diferenciar isolados de *Escherichia coli* intestinal e extra-intestinal, como os isolados uropatogênicos (köhler *and* Dobrindt, 2011; Pitout, 2012d). Isolados de *Escherichia coli* extra-intestinal podem apresentar diversos fatores de virulência incluindo toxinas, adesinas, lipopolissacarídeos, cápsula, proteases e invasinas (köhler *and* Dobrindt, 2011; Pitout, 2012d; Spurbeck *et al*, 2012), presentes no cromossoma em ilhas de patogenicidade (PAI) ou em elementos genéticos móveis como plasmídeos e/ou bacteriófagos (Pitout, 2012d; da Silva *and* Mendonça, 2012). Fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* extra-intestinal contribuem para o *fitness* bacteriano e são responsáveis pela adaptabilidade, competitividade, capacidade de colonização e conseqüentemente, desenvolvimento de infecção (Tenaillon *et al*, 2010; köhler *and* Dobrindt, 2011; Pitout, 2012d).

O trato intestinal humano é o principal reservatório de *Escherichia coli* uropatogênica que pode apresentar diversos fatores de virulência relacionados com a capacidade de colonização e infecção do trato urinário (Pitout, 2012d; Spurbeck *et al*, 2012) que incluem mecanismos de aderência, produção de toxinas, mobilidade, sideróforos e evasão das defesas do sistema imune (Nielubowicz *and* Mobley, 2010; Totsika *et al*, 2011). Genes que codificam importantes fatores de virulência em *Escherichia coli* como adesinas, fímbrias, sistema de aquisição de ferro como os sideróforos, toxinas e cápsula, encontram-se em segmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA) denominados ilhas de patogenicidade (PAI) (Johnson *and* Stell, 2000; Platell *et al*, 2011; Domingo, 2013). Estas regiões que podem variar entre 20-200kb (Domingo, 2013), caracterizam-se por estarem presentes no cromossoma bacteriano (Figura 3) (Johnson *and* Stell, 2000; Platell *et al*, 2011; Domingo, 2013).

O processo de aderência de *Escherichia coli* ao epitélio urinário é indubitavelmente a fase mais importante no desenvolvimento de colonização e infecção, permitindo resistência às forças hidrodinâmicas do fluxo de urina (Domingo, 2013). As fímbrias, de origem proteica, são as principais estruturas de aderência a receptores específicos existentes nas membranas das células epiteliais humanas, podendo cada estirpe conter diferentes fímbrias, simultaneamente (Nielubowicz *and* Mobley, 2010; Domingo, 2013). Os principais grupos de genes que codificam fímbrias, incluem fímbrias do tipo 1, a mais comum em espécies de *Enterobacteriaceae* (Domingo, 2013), fímbrias do tipo P (Pap/Prf), associadas ao operão pap apresentando três variantes moleculares codificadas pelos alelos papG alelo I, papG alelo II e papG alelo III, fímbria S/F1C (Sfa/Foc), fímbria Dr, adesina fimbrial (Afa), fímbria S e fímbria M (Nielubowicz *and* Mobley, 2010; köhler *et al*, 2011). A fímbria *fimH*, presente na parte distal da fímbria tipo

1, codificada no operão fim, medeia a ligação e invasão do epitélio da bexiga pela ligação com as unidades terminais α -D-manosiladas da uroplaquinas, expressas abundantemente no epitélio urinário (Domingo, 2013), facilitando a colonização e invasão do endotélio da bexiga (Totsika *et al*, 2011). Os três tipos de toxinas produzidos por *Escherichia coli* uropatogénica incluem α -hemolisina, com capacidade de lise celular, fator necrotizante citotóxico 1 (CNF-1) e toxinas autotransportadoras, como é exemplo a toxina SAT que induz efeitos citopáticos em células vesicais e renais, VAT (autotransportador de serina) responsável por efeitos citopáticos nas células epiteliais e as toxinas PIC e Tsh (Nielubowicz *and* Mobley, 2010; Domingo, 2013). A α -hemolisina, codificada no gene *hlyA* do operão *hly*, apresenta capacidade de destruição eritrocitária, células endoteliais e do epitélio renal, monócitos e granulócitos. O factor de virulência CNF-1 ou factor necrotizante 1 apresenta um papel importante na passagem do sistema urinário para o sistema sanguíneo. A mobilidade é mediada por complexo de estruturas flagelares (Nielubowicz *and* Mobley, 2010). Sistemas de captação de ferro são fundamentais em isolados de *Escherichia coli* uropatogénica, mediante produção e excreção de sideróforos no trato urinário (Domingo, 2013), como aerobactina, enterobactina e yersiniabactina, que podem ser codificados e expressos simultaneamente (Nielubowicz *and* Mobley, 2010; Domingo, 2013).

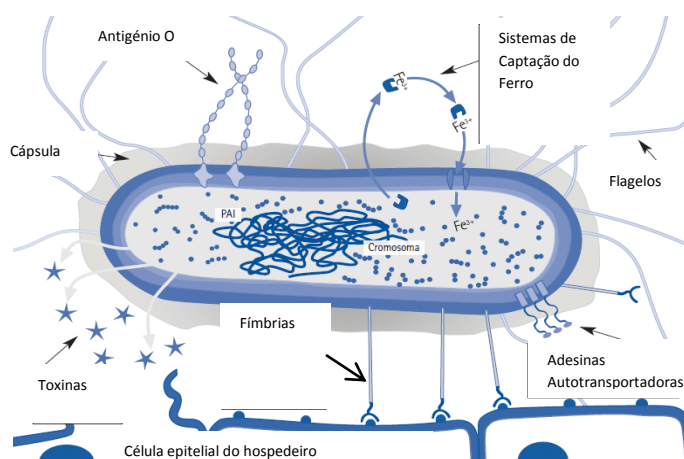


Figura 3 – Principais fatores de virulência de isolados de *Escherichia coli* uropatogénicos (adaptado de Domingo, 2013).

1.4.2 – *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae é encontrada em diferentes nichos ambientais como água e solo, e como colonizadora da pele, nasofaringe e trato intestinal do Homem (Brisse *et*

al, 2009; Tzouvelekis *et al*, 2012). Este bacilo de Gram negativo encontra-se frequentemente associado a infecções hospitalares e na comunidade, como infecções do trato urinário, trato respiratório, bacteriemia e infecção dos tecidos moles (Brisse *et al*, 2009). Infecções por *Klebsiella pneumoniae* na comunidade encontram-se relacionadas com pneumonia, abscesso do fígado, endoftalmite e outras infecções metastáticas (Keynan *and* Rubinstein, 2007; Tzouvelekis *et al*, 2012).

Isolados de *Klebsiella pneumoniae* responsáveis por infecções hospitalares e na comunidade podem apresentar fenótipo multirresistente aos antibióticos (Brisse *et al*, 2009), associado a clones multirresistentes aos antibióticos, responsáveis por infecções hospitalares, particularmente em unidades de neonatologia e na comunidade (Endimiani *and* Bonomo, 2008; Carrer *and* Nordmann, 2011; Baraniak *et al*, 2013). Os principais fatores de virulência associados compreendem cápsula, lipopolissacarídeos, sistemas de captação de ferro e adesinas fimbriais (Brisse *et al*, 2009).

2 – Enterobacteriaceae produtoras de ESBLs e de carbapenemases

A descoberta da penicilina em 1928 por Alexander Fleming (Perry *and* Wright, 2013) e consequente utilização dos antibióticos no século XX revolucionaram a ciência e medicina, contribuindo de forma significativa para a diminuição da taxa de mortalidade e morbidade (Furuya *and* Lowy, 2006; Theuretzbacher, 2011; Carlet *and* Pittet, 2013; Paphiton, 2013). A utilização indiscriminada e por vezes inapropriada (McClean *et al*, 2011) destas substâncias quimioterapêuticas de origem natural, semi-sintéticas ou sintéticas com função bacteriostática ou bactericida, induziram mudanças substanciais no comportamento bacteriano, conduzindo à diminuição da eficácia e seleção de bactérias resistentes aos antibióticos (da Silva *and* Mendonça, 2012; Rolain, 2013).

Os mecanismos de ação dos antibióticos em *Enterobacteriaceae* consistem na inibição da síntese da parede celular (antibióticos β -lactâmicos), inibição da síntese proteica (tetraciclina, aminoglicosídeos), inibição da síntese de ácido fólico (sulfonamidas e trimetoprim) e inibição da síntese de DNA (fluoroquinolonas) (Levy *and* Marshall, 2004; Wright, 2010) (Figura 4).

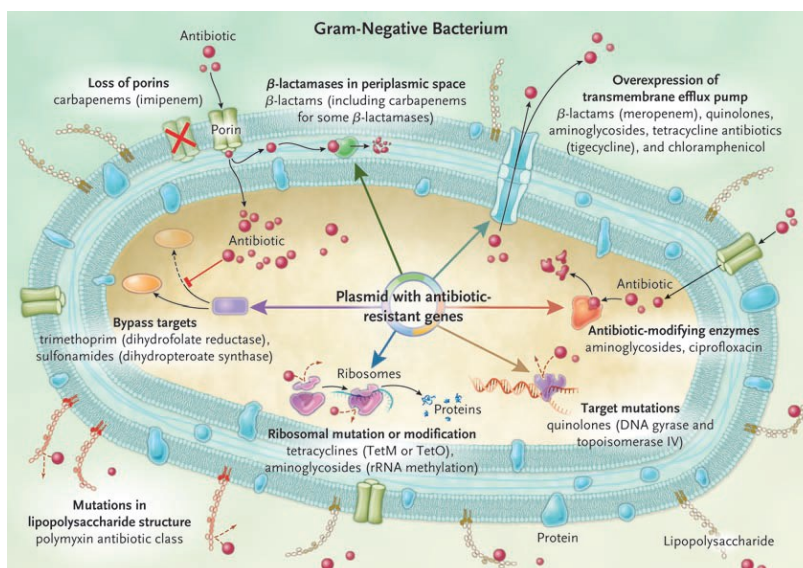


Figura 4 - Locais de ação dos principais grupos de antibióticos β -lactâmicos e não- β -lactâmicos em bactérias de Gram negativo e respectivos mecanismos de resistência aos antibióticos (*adaptado de Peleg and Hooper, 2010*).

2.1 – Antibióticos β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos representam o grupo de antibióticos mais utilizados em terapêutica clínica, introduzidos em 1940 para tratamento de infecções por *Enterobacteriaceae*, evidenciando-se dos diferentes grupos de antibióticos pela elevada eficácia antibacteriana, características farmacocinéticas e reduzida toxicidade para o Homem (Pfeifer *et al*, 2010; Beceiro *et al*, 2012; Lewis, 2013).

As principais classes deste grupo de antibióticos β -lactâmicos consistem nas penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemos, que caracterizam-se pela presença comum de estrutura cíclica, denominada anel β -lactâmico, constituído por três átomos de carbono e um átomo de azoto, com cadeias laterais que determinam propriedades farmacocinéticas e antibacterianas das diferentes classes (Nordmann *et al*, 2006, Drawz and Bonomo, 2010; Beceiro *et al*, 2012; Zeng and Lin, 2013). O anel β -lactâmico pode estar isolado, como nos monobactâmicos, ou associado em estruturas de anel bicíclico, como nas penicilinas, condensado com um anel de tiazolidina, nas cefalosporinas, fundido com um anel de dihidrotiazina e nos carbapenemos, combinado com uma cadeia lateral de hidroxietilo (Figura 5).

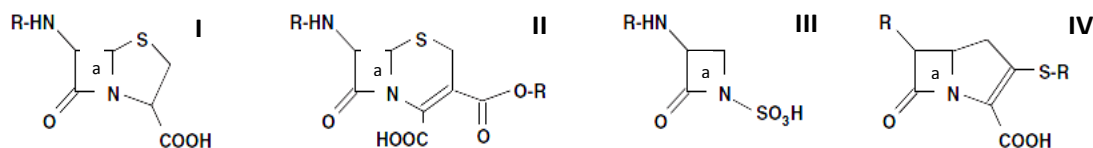


Figura 5 - Estrutura química representativa dos quatro grupos de antibióticos β -lactâmicos (*adaptado de Nordmann et al, 2012b*).

Legenda: **I** - penicilinas; **II** - cefalosporinas; **III** - monobactâmicos; **IV** - carbapenemos; **a** - anel β -lactâmico.

O mecanismo de ação dos antibióticos β -lactâmicos consiste na inibição da fase final da biossíntese do peptidoglicano, componente essencial da parede celular bacteriana, através da inativação das *Penicillin-Binding-Proteins* (PBPs) responsáveis pela transpeptidação (Llarrull *et al*, 2010; García-Hernández *et al*, 2011; Zeng and Lin, 2013). A entrada dos antibióticos β -lactâmicos no espaço periplasmático da parede celular das *Enterobacteriaceae* é facilitada pela passagem pelas porinas, presentes na membrana externa (Figura 6).

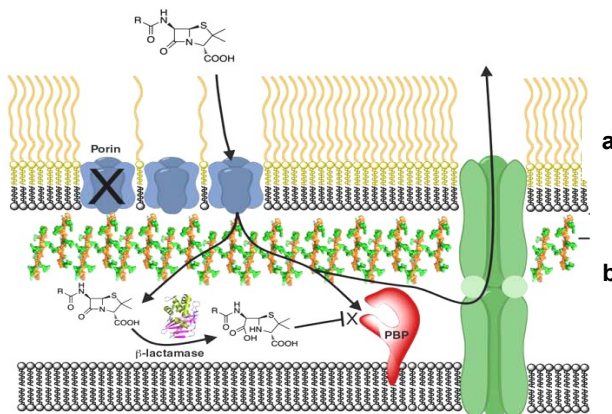


Figura 6 - Estrutura da parede celular de bactérias de Gram negativo e local de ação dos antibióticos β -lactâmicos (*adaptado de Llarruff et al, 2010*).

Legenda: A parede celular de Gram negativo é uma estrutura complexa constituída por **a** - membrana externa e uma **b** - camada fina de peptidoglicano presente no espaço periplasmático.

Os antibióticos β -lactâmicos ligam-se às PBPs, inibindo-as de forma irreversível, impedindo o processo de *cross-linking* e consequentemente biossíntese do peptidoglicano (Llarruff *et al*, 2010; Zeng and Lin, 2013). A semelhança estrutural entre a ligação amida do anel β -lactâmico e a ligação peptídica análoga da D-alanil-D-alanina no peptidoglicano facilita a capacidade de inibição das carboxipeptidases e transpeptidases, pela formação de ésteres estáveis entre o anel β -lactâmico e o grupo hidroxilo da enzima (Llarruff *et al*, 2010; Nordmann *et al*, 2012b; Zeng and Lin, 2013).

2.1.1 - Mecanismos de Resistência aos antibióticos β -lactâmicos

A eficácia dos antibióticos β -lactâmicos em *Enterobacteriaceae* é constantemente desafiada pela emergente resistência a este grupo de compostos (Beceiro *et al*, 2012; Lewis, 2013). Os mecanismos subjacentes à resistência aos antibióticos β -lactâmicos são quatro, que podem atuar independentemente ou em combinação, no sentido de aumentar os níveis de resistência aos antibióticos (Scott, 2009; Drawz *and* Bonomo, 2010, Papp-Wallace *et al*, 2011; Schmieder *and* Edwards, 2012, Beceiro *et al*, 2012; Talbot, 2013; Wright, 2010; Zeng *and* Lin, 2013).

i) Modificação das PBPs: Consiste na modificação das PBPs, resultado da ação de um dos três mecanismos: i) substituição de aminoácidos que promove a diminuição da afinidade entre o antibiótico e as PBPs; ii) aquisição de novas PBPs; iii) recombinação de genes que codificam PBPs, com diminuição da afinidade para os antibióticos β -lactâmicos, resultando na diminuição da suscetibilidade de ligação das PBPs com os antibióticos (Drawz *and* Bonomo, 2010).

ii) Redução da permeabilidade da membrana externa: A entrada de antibióticos β -lactâmicos em bacilos de Gram negativo é facilitada pela existência de complexos de proteínas de membrana, *Outer Membrane Proteins* (OMPs) também designados canais de porina. A diminuição da susceptibilidade aos antibióticos β -lactâmicos pode ser explicada pela ausência ou alteração na permeabilidade da membrana externa, por ausência ou expressão diminuída de porinas (Drawz *and* Bonomo, 2010). Redução da permeabilidade da membrana externa é um mecanismo importante na resistência aos carbapenemos em *Enterobacteriaceae*, geralmente em associação com mecanismos de resistência degradativos. A expressão diminuída e/ou ausência das porinas OmpK35 e OmpK36 em *Klebsiella pneumoniae* e OmpC em *Escherichia coli* estão associadas à diminuição da suscetibilidade aos β -lactâmicos, incluindo cefamicinas e carbapenemos (Drawz *and* Bonomo, 2010).

iii) Mecanismos de Efluxo: As bombas de efluxo são importantes determinantes de resistência aos antibióticos, presentes em bacilos de Gram negativo, nomeadamente em *Acinetobacter* spp, *Pseudomonas aeruginosa* (Drawz *and* Bonomo, 2010) e em *Enterobacteriaceae* (Scott, 2009) codificados no cromossoma ou em plasmídeos (El Salabi *et al*, 2013). O mecanismo de ação baseia-se na expulsão activa dos antibióticos do espaço periplasmático para o espaço extracelular, reduzindo a concentração de

antibiótico no interior da bactéria, impedindo-o de exercer a sua função (Allen *et al*, 2010; El Salabi *et al*, 2013).

iv) Produção de β -lactamases: As β -lactamases, presentes no espaço periplasmático da parede celular de bacilos de Gram negativo, hidrolisam o anel β -lactâmico dos antibióticos β -lactâmicos, tornando-os inativos antes de atuarem nas PBPs. Representa o principal mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em *Enterobacteriaceae* (Bonnet, 2004; Falagas *and* Karageorgopoulos, 2009; Mulvey *and* Simor, 2009; Bush *and* Jacoby, 2010a; Drawz *and* Bonomo, 2010, Bassetti *et al*, 2011, Dhillon *and* Clark, 2012; Zeng *and* Lin, 2013).

2.1.2 – Combinação de antibióticos β -lactâmicos com inibidores de β -lactamases

Os inibidores das β -lactamases apresentam estrutura química semelhante aos antibióticos β -lactâmicos com presença do anel β -lactâmico, fundamental na ligação irreversível ao local de ação das β -lactamases, tornando-as inativas (Nordmann *et al*, 2012b). O ácido clavulânico, frequentemente utilizado na clínica, foi o primeiro inibidor das β -lactamases introduzido na prática clínica, e mais tarde o sulbactam e tazobactam por alterações estruturais com objetivo de melhorar a atividade inibitória dos antibióticos β -lactâmicos. O grau de atividade dos inibidores das β -lactamases é variável de acordo com a função do tipo de inibidor e β -lactamase presente (Falagas *and* Karageorgopoulos, 2009).

2.2 – β -lactamases

Identificadas em 1940, um ano antes da utilização da penicilina, por Abraham e Chain num isolado de *Escherichia coli*, representam o mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos mais significativo em *Enterobacteriaceae* (Bonnet, 2004; Pitout, 2008; Falagas *and* Karageorgopoulos, 2009; Bush, 2010b; Drawz *and* Bonomo, 2010; Bush *and* Fisher, 2011; Cantón *et al*, 2012; Dhillon *and* Clark, 2012; Bush, 2013a, Bush, 2013c). Este grupo complexo e heterogêneo excede as 1300 β -lactamases descritas na literatura e no site Lahey Clinic β -lactamases, <http://www.lahey.org/studies/webt.htm> (Bush, 2010a; Bush *and* Jacoby, 2010; Bush, 2013c).

Inúmeras classificações surgiram ao longo dos anos como resposta à constante descoberta e diversidade de β -lactamases (Pfeifer *et al*, 2010; Bush *and* Fisher, 2011; Bush, 2013a; Bush, 2013c). A classificação molecular de Ambler e a classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros representam os esquemas de classificação das β -lactamases mais utilizados, fundamentados respectivamente na similaridade da sequência de aminoácidos e características funcionais das enzimas (Bush *et al*, 1995; Helfand *and* Bonomo, 2005; Giske *et al*, 2009; Bush *and* Jacoby, 2010; Kong *et al*, 2010; Bush, 2013a; El Salabi *et al*, 2013) (Tabela 1).

i) Classificação molecular de Ambler: Proposta por Ambler em 1980 baseia-se na homologia das sequências de nucleótidos e de aminoácidos das β -lactamases, agrupando-as em quatro classes: A, B, C e D (Helfand *and* Bonomo, 2005; Bush *and* Jacoby, 2010; Kong *et al*, 2010; Bush, 2013c; Talbot, 2013). As β -lactamases da classe A (penicilinasas), C (cefalosporinasas) e D (oxacilinasas) incluem as enzimas com resíduo de serina no centro activo, e as da classe B (metalo- β -lactamases) compreende as enzimas que apresentam iões metálicos no centro activo, como o zinco (Helfand *and* Bonomo, 2005; Bush *and* Jacoby, 2010; Kong *et al*, 2010; Pfeifer *et al*, 2010; Bush, 2013a; El Salabi *et al*, 2013).

ii) Classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros: Em 1995, proposta por Bush-Jacoby-Medeiros baseia-se nas características funcionais das β -lactamases e na correlação com os grupos moleculares definidos por Ambler. Esta classificação agrupa as β -lactamases em quatro grupos funcionais, 1 a 4, e em seis subgrupos, (a-f), de acordo com o perfil de substrato, inibidores e estrutura molecular (Helfand *and* Bonomo, 2005; Bush *and* Jacoby, 2010):

i) Grupo 1 / Classe molecular de Ambler C: compreende as β -lactamases cromossómicas, que hidrolisam todos os antibióticos β -lactâmicos exceto os carbapenemos e fracamente inibidas pelo ácido clavulânico.

ii) Grupo 2 / Classe molecular de Ambler A e D: inclui vários tipos de β -lactamases como as penicilinasas, cefalosporinasas, oxacilinasas e carbapenemases, incluindo as ESBLs, inibidas pelo ácido clavulânico,

iii) Grupo 3 / Classe Molecular de Ambler B: abrange as metalo- β -lactamases (MBLs), que hidrolisam penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos, exceto os monobactâmicos e são inibidas pelo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA).

iv) Grupo 4: Penicilinasas sem grupo molecular correspondente.

Tabela 1 - Classificação das β -lactamases segundo Ambler e Bush-Jacoby-Medeiros

Bush-Jacoby (2009)	Ambler	Substratos preferenciais	Inibido por		β -lactamases representativas
			Ácido clavulânico	EDTA	
1	C	Cefalosporinas	-	-	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1, ACC-1, LAT, MOX-1, MOX-2, DHA-1, CFE-1
1e	C	Cefalosporinas	-	-	GC1, CMY-37
2a	A	Penicilinas	+	-	PC1
2b	A	Penicilinas, Cefalosporinas 1ª geração	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penicilinas, Cefalosporinas (1ª a 4ª geração), monobactâmicos	+	-	ESBL: TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penicilinas, inibidores das β -lactamases	-	-	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Cefalosporinas de largo espectro, monobactâmicos	-	-	TEM-50
2c	A	Penicilinas, Carbenicilina	+	-	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbenicilina, cefepime	+	-	RTG-4

Legenda: EDTA - ácido etilenodiaminotetracético; NI - não incluído, ND - não determinada; (-) - não inibido; (+) - inibido; ni - não identificado (adaptada de Bush *et al*, 1995; Bush *and* Jacoby, 2010).

Tabela 1 (Continuação) - Classificação das β -lactamases segundo Ambler e Bush-Jacoby-Medeiros

Bush-Jacoby (2009)	Ambler	Substratos preferenciais	Inibido por		β -lactamases representativas
			Ácido clavulânico	EDTA	
2d	D	Penicilinas, cloxacilina	Variável	-	OXA-1, OXA-10
2de	D	Penicilinas, Cefaloporinas de largo espectro, Monobactâmicos	Variável	-	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenemos	Variável	-	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefaloporinas de largo espectro	+	-	CepA
2f	A	Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenemos	Variável	-	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B (B1)	Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenemos	-	+	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
	B (B3)				L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	B (B2)	Carbapenemos	-	+	CphA, Sfh-1
NI	ND	Penicilinas	ni	ni	ni

Legenda: EDTA - ácido etilenodiaminotetracético; NI = não incluído, ND - não determinada; (-) - não inibido; (+) - inibido; ni - não identificado (adaptada de Bush *et al*, 1995; Bush *and* Jacoby, 2010).

2.3 – β -lactamases de Espectro Alargado - ESBLs

A evolução e epidemiologia das *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases de Espectro Alargado (ESBLs)¹ é complexa e dinâmica, despertando o interesse da comunidade médica e científica, desde a identificação da primeira ESBL do tipo SHV em 1983 na Alemanha (Pitout *et al*, 2005; Cantón *and* Coque, 2006; Gniadkowski, 2001; Cantón *et al*, 2012; Pitout, 2012d). As ESBLs apresentam capacidade de hidrólise das penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos, com exceção das cefamicinas e carbapenemos, e são inibidas por inibidores clássicos das β -lactamases como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (Pitout *et al*, 2005; Cantón *et al*, 2008; Falagas *and* Karageorgopoulos, 2009; Pitout, 2009; Drawz *and* Bonomo, 2010; Lee *et al*, 2012; Peirano *and* Pitout, 2010; Chong *et al*, 2011; Dhillon *and* Clark, 2012; Gazin *et al*, 2012; Pitout, 2012d; Bush, 2013c; Seiffert *et al*, 2013).

Escherichia coli e *Klebsiella pneumoniae* são as principais espécies da família *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs (Pitout, 2012d). Outras espécies desta família e bacilos de Gram negativo como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* são também produtores destas enzimas. A classificação desta família heterógena e clinicamente relevante de β -lactamases, baseia-se na sequência de aminoácidos e atividade hidrolítica em relação aos diferentes antibióticos β -lactâmicos. As ESBLs pertencem à classe A segundo Ambler que incluem três grupos representados pelas β -lactamases TEM, SHV e CTX-M, e pelas enzimas da classe D do tipo OXA (Bradford, 2001; Cantón *et al*, 2008; Drawz *and* Bonomo, 2010; Lee *et al*, 2012; Chong *et al*, 2011; Dhillon *and* Clark, 2012). Outras ESBLs descritas em *Enterobacteriaceae* apresentam prevalência reduzida como é exemplo as PER, VEB, GES, TLA e IBC, e parecem estar confinadas a determinadas regiões geográficas (Bradford, 2001; Pitout *and* Laupland, 2008; Pitout, 2009; Dhillon *and* Clark, 2012).

A maior parte das ESBLs identificadas entre 1980 e 1990, TEM e SHV, evoluíram das β -lactamases clássicas TEM-1, TEM-2 e SHV-1, por mutações na sequência de aminoácidos conferindo resistência às cefalosporinas de terceira e quarta geração, nomeadamente cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima e cefepime (Pfeifer *et al*, 2010; Chong *et al*, 2011; Pitout, 2012d). As ESBLs do tipo CTX-M surgiram a partir de 2000 e apresenta evolução independente das ESBLs do tipo TEM e SHV (Chong *et al*, 2011; Pitout, 2012d). A introdução de cefalosporinas de largo espectro de ação em terapêutica

¹ Neste trabalho é utilizada a sigla ESBL da designação em inglês *Extended Spectrum Beta-Lactamase* para designação de Beta-Lactamases de Espectro Alargado

clínica e a presença de genes codificadores em elementos genéticos móveis como plasmídeos permitiu a rápida disseminação das ESBLs do tipo CTX-M, em diferentes nichos como as unidades hospitalares e na comunidade. Os isolados produtores de ESBLs podem albergar genes de resistência aos antibióticos não β -lactâmicos, como aminoglicosídeos, tetraciclinas, fluoroquinolonas, cloranfenicol e trimetoprim-sulfametoxazol justificando a existência de fenótipos multirresistentes aos antibióticos (Pitout *et al*, 2005; Cantón *et al*, 2008; Pitout, 2009; Peirano *and* Pitout, 2010; Pfeifer *et al*, 2010; Bush *and* Fisher, 2011; Chong *et al*, 2011; Dhillon *and* Clark, 2012).

2.2.1 – β -lactamases do tipo TEM

As β -lactamases do tipo TEM² (**Temoniera**) constituem a maior família de β -lactamases, com mais de 213 variantes descritas no site <http://www.lahey.org> e amplamente disseminadas (Poirel *et al*, 2012b). TEM-1 é a β -lactamase mais frequente em *Enterobacteriaceae*, identificada no início de 1960 num isolado de *Escherichia coli* numa amostra de hemocultura de um doente na Grécia (Bradford, 2001; Stürenburg *and* Mack, 2003), responsável por aproximadamente 90% de resistência à ampicilina em *Escherichia coli* (Bradford, 2001). A localização em plasmídeos e transposões facilitou a disseminação de TEM-1 em *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* (Bradford, 2001; Stürenburg *and* Mack, 2003).

Mutações no gene *bla*_{TEM-1} permitiram a evolução desta família de β -lactamases conferindo fenótipo de ESBLs, pela capacidade de hidrólise às cefalosporinas de largo espectro de ação (Stürenburg *and* Mack, 2003). TEM-3, primeira β -lactamase da família TEM com fenótipo de ESBL, foi descrita em 1987 em França, num isolado de *Klebsiella pneumoniae* proveniente de um doente internado numa unidade de cuidados intensivos (Bradford, 2001; Stürenburg *and* Mack, 2003)

2.2.2 – β -lactamases do tipo SHV

² As β -lactamases resistentes aos inibidores das β -lactamases (IRT) derivadas das β -lactamases TEM-1 e SHV-1 não são ESBLs (Bradford, 2001; Babic *et al*, 2006). Identificadas na década de 90, as IRT são resistentes à inibição pelo inibidor das β -lactamases, ácido clavulânico. As IRT são encontradas principalmente em *Escherichia coli* e em outras espécies como *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Citobacter freundii*, responsáveis pelo fenótipo de resistência à associação amoxicilina/ácido clavulânico (Babic *et al*, 2006).

SHV-1 (sulphydryl variable) é uma β -lactamase cromossômica frequente em *Klebsiella pneumoniae* responsável pela resistência às penicilinas (Stürenburg and Mack, 2003) e codificada em plasmídeos em outras espécies da família das *Enterobacteriaceae* como em *Escherichia coli* (Bradford, 2001; Stürenburg and Mack, 2003). As enzimas SHV-1 compartilham 68% dos seus aminoácidos com TEM-1 (Bradford, 2001). As ESBLs do tipo SHV resultam de mutações pontuais na sequência das β -lactamases SHV-1 e SHV-11, de origem cromossômica de *Klebsiella pneumoniae* (Poirel, 2012).

Esta família de β -lactamases com mais de 178 β -lactamases descritas (<http://lahey.org/studies>) é frequente em *Klebsiella pneumoniae*. Outras espécies de bacilos de Gram negativo têm sido identificadas como produtores destas enzimas como outras espécies de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp (Paterson and Bonomo, 2005). Estas enzimas apresentam menor diversidade comparativamente com as β -lactamases TEM e têm sido descritas em diversos países (Poirel, 2012). A primeira β -lactamase SHV com fenótipo ESBL, SHV-2, descrita em 1983 na Alemanha, num isolado de *Klebsiella pneumoniae* resistente à cefotaxima, diferenciava-se de SHV-1 pela substituição de glicina por serina na posição 238 (Bradford, 2001; Stürenburg and Mack, 2003; Paterson and Bonomo, 2005).

2.2.3 – β -lactamases do tipo CTX-M

As β -lactamases do tipo CTX-M (**C**efo**TaXiM**ases), descritas no início de 1990 em Munique em isolados de *Escherichia coli*, têm vindo a substituir na última década as β -lactamases clássicas TEM e SHV (Peirano and Pitout, 2010; Pfeifer *et al*, 2010, Poirel *et al*, 2012b). Predominantes em todo o Mundo, compreendem uma das famílias de β -lactamases mais complexas e heterogêneas da classe molecular A com centro activo de serina, difundidas em diferentes nichos, nomeadamente no ambiente clínico e comunidade (Cantón *et al*, 2008; Novais *et al*, 2010; D'Andrea *et al*, 2013). Caracterizam-se pela hidrólise das penicilinas, cefalosporinas de largo espectro de ação, monobactâmicos e inibição por inibidores clássicos das β -lactamases, como o ácido clavulânico (Paterson and Bonomo, 2005; Poirel *et al*, 2012b). As primeiras enzimas CTX-M hidrolizavam de forma mais eficazmente a cefotaxima comparativamente à ceftazidima (Pitout *et al*, 2005; Poirel *et al*, 2012b). No entanto, novas variantes como as enzimas CTX-M-15 e CTX-M-19 inverteram esta característica (Paterson and Bonomo, 2005; Novais *et al*, 2010).

Genes codificadores de CTX-M têm sido identificados em diversas espécies da família *Enterobacteriaceae*, principalmente em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*,

que representam as principais espécies produtoras desta família de ESBLs plasmídicas (Falagas and Karageorgopoulos, 2009) com mais de 150 variantes descritas no site <http://lahey.org/studies>. As β -lactamases do tipo CTX-M são agrupadas em seis grupos filogenéticos, de acordo com a descrição recente num artigo de revisão (D'Andrea *et al*, 2013). A homologia da sequência de aminoácidos das β -lactamases do tipo CTX-M permite a classificação em CTX-M-1, grupo CTX-M-2, grupo CTX-M-8, grupo CTX-M-9, grupo CTX-M-25 e grupo KLUC (Figura 7). Cada grupo desta família apresenta variantes alélicas menores com diferença em pequenas substituições de aminoácidos (inferior a 5% de resíduos de aminoácidos) (D'Andrea *et al*, 2013).

A análise filogenética destas enzimas sugere evolução de genes cromossómicos de diferentes espécies de *Kluyvera* spp de origem ambiental, raramente associada a infeções no Homem (Paterson and Bonomo, 2005; Pitout and Laupland, 2008; Falagas and Karageorgopoulos, 2009; Peirano and Pitout, 2010; Pfeifer *et al*, 2010; Cánton *et al*, 2012; Poirel *et al*, 2012b; D'Andrea *et al*, 2013). Cada grupo das β -lactamases CTX-M pode ser detectado no cromossoma de diferentes espécies de *Kluyvera* spp (D'Andrea *et al*, 2013), assim o grupo CTX-M-1 e o grupo CTX-M-2 apresentam o gene precursor *kluA1-11* em *Kluyvera ascorbata*, o grupo CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25 o gene *kluG1* em *Kluyvera georgiana* e o grupo KLUC o gene *kluc-1* em *Kluyvera cryocrescens* (Cánton *et al*, 2008; Pitout and Laupland, 2008; Falagas and Karageorgopoulos, 2009; Pfeifer *et al*, 2010; D'Andrea *et al*, 2013).

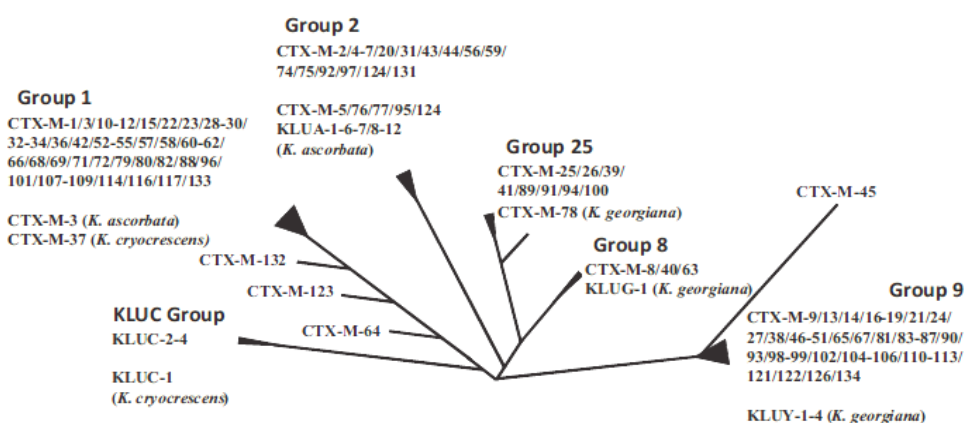


Figura 7 - Relação filogenética da família das β -lactamases do tipo CTX-M (*adaptado de D'Andrea et al*, 2013).

Legenda: o dendrograma apresenta a similaridade entre os diferentes grupos de CTX-M e os membros dos diferentes grupos de enzimas CTX-M (*adaptado de D'Andrea et al*, 2013). grupo CTX-M-1 - CTX-M-10-12/22/23/28-30/32-34/36/37/42/52-54/57/58/60/61; grupo CTX-M-2 - variantes CTX-M-2,-4-7, 20, 31, 35, 43, 44; grupo CTX-M-8 - variantes CTX-M-8, CTX-M-40, CTX-M-63; grupo CTX-M-9 - variantes CTX-M-9,-13, -14, -16, 17 a -19, -21,-24, -27,-38, -46 a 51, -55, -65; grupo CTX-M-25 - variantes CTX-M-25, -26, -39 e -41; grupo KLUC - variantes KLUC -2-4.

O cenário epidemiológico actual das ESBLs do tipo CTX-M compreende o aparecimento de novas variantes, existência de múltiplos clones multirresistentes aos antibióticos associados a surtos em unidades de prestação de cuidados de saúde e na comunidade e associação a elementos genéticos móveis envolvidos na disseminação destas enzimas, justificando a elevada prevalência destas enzimas em todo o Mundo (Peirano *and* Pitout, 2010; Pfeifer *et al*, 2010; Olesen *et al*, 2013). A evolução da família de β -lactamases CTX-M foi influenciada a nível molecular, por eventos de recombinação do gene *bla*_{CTX-M} em sequências de inserção *ISEcp1* e *ISCR1* associadas com integrões de classe 1 (Pfeifer *et al*, 2010) e plasmídeos (El Salabi *et al*, 2013). A disseminação actual dos genes *bla*_{CTX-M}, contínua e persistente em diversos nichos, é facilitada pela disseminação clonal de *Enterobacteriaceae* produtoras de CTX-M, disseminação de plasmídeos e/ou transposões entre diferentes espécies de bacilos de Gram negativo e translocação de genes de resistência entre diferentes elementos genéticos móveis (Pfeifer *et al*, 2010) e sequências fágicas. Estas enzimas estão associadas a integrões com genes que codificam β -lactamases de outras famílias, como os genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{OXA}, genes que codificam resistência a antibióticos não β -lactâmicos como aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e sulfamidas (Pitout *et al*, 2005; Pitout *and* Laupland, 2008; Rossolini *et al*, 2008; Peirano *and* Pitout, 2010; Pfeifer *et al*, 2010; Chong *et al*, 2011; D'Andrea *et al*, 2013; Wellington *et al*, 2013).

Escherichia coli extra-intestinal produtora de CTX-M é importante em infeções na comunidade como infeção do trato urinário, bacteriémia e infeções gastrointestinais (Pitout, 2012d). *Escherichia coli* produtora de CTX-M apresenta variações geográficas, com elevada prevalência do grupo CTX-M-1 em Itália e Holanda, grupo CTX-M-2 na Argentina e Israel, grupo CTX-M-3 na Polónia, grupo CTX-M-9 em Espanha e os grupos CTX-M-14 e CTX-M-15 distribuídos mundialmente (Pitout, 2012) (Figura 8). As ESBLs de maior relevância clínica e predominantes CTX-M-15, e as CTX-M-3 e CTX-M-1 estão incluídas no grupo filogenético CTX-M-1 e a ESBL CTX-M-14 no grupo filogenético CTX-M-9 (Bush, 2013a; Poirel *et al*, 2012b). A prevalência de *Enterobacteriaceae* produtoras de CTX-M centra-se na Europa, Ásia e América do Sul (Figura 8) (Urban *et al*, 2010; Poirel *et al*, 2012b).

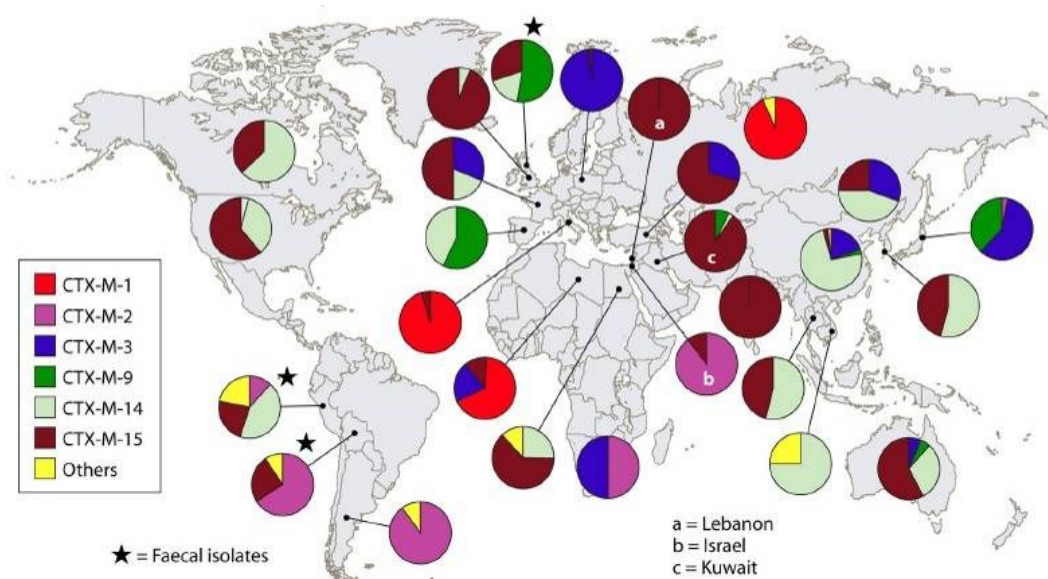


Figura 8 - Distribuição mundial de β -lactamases do tipo CTX-M (*adaptado de Davies and Davies, 2010*)

A epidemiologia de *Escherichia coli* produtora de CTX-M-15 tem sido descrita em diversos países incluindo Rússia, Inglaterra, Índia, Espanha, Portugal, Áustria, Itália, França, Suécia, Canadá e Estados Unidos da América. *Escherichia coli* produtora de CTX-M-15 é endêmica na Índia, representando este País um importante reservatório destas β -lactamases (Peirano and Pitout, 2010).

2.2.4 – β -lactamases do tipo OXA

As β -lactamases do tipo OXA (**ox**acilinas) representam uma família diversificada e emergente de β -lactamases classificadas na classe molecular D subgrupo 2d, descritas pela primeira vez em *Pseudomonas aeruginosa* na Turquia (Bradford, 2001; Stürenburg and Mack, 2003; Helfand and Bonomo, 2005; Paterson and Bonomo, 2005; Poirel *et al*, 2010). Estas enzimas conferem resistência à ampicilina e cefalotina e caracterizam-se pela elevada hidrólise da oxacilina e cloxacilina e fraca inibição pelo ácido clavulânico (Bradford, 2001; Stürenburg and Mack, 2003; Paterson and Bonomo, 2005; Drawz and Bonomo, 2010; Poirel *et al*, 2010). As β -lactamases do tipo OXA são frequentemente descritas em *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* e *Acinetobacter spp* (Stürenburg and Mack, 2003; Poirel *et al*, 2010). Algumas β -lactamases do tipo OXA apresentam aumento do espectro de hidrólise em relação às cefalosporinas, OXA-1, e aos carbapenemos, OXA-48 (Walsh, 2010). Em *Enterobacteriaceae*, o gene *bla*_{OXA-1} tem

sido frequentemente associado com o gene *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{TEM-1} em vários países (Poirel *et al*, 2010).

2.4 – Carbapenemases

As carbapenemases representam um grupo heterogêneo de β -lactamases com capacidade de hidrólise dos carbapenemos, que pertencem a três classes moleculares diferentes, classe A, B e D e sub-grupos 2f, 2df e 3, de acordo com a composição do centro ativo da β -lactamase, serina ou zinco, propriedades de hidrólise dos antibióticos β -lactâmicos, incluindo os carbapenemos e inibição pelos inibidores das β -lactamases (Cornaglia *et al*, 2011; Chen *and* Ko, 2010; Miriagou *et al*, 2010; Papp-Wallace, 2011; Birgy *et al*, 2012; Cantón *et al*, 2012; Nordmann *et al*, 2012a; Bush, 2013b; Hara *et al*, 2013). As carbapenemases da classe A, como as KPC, e as da classe D, como são exemplo as OXA-48, apresentam serina no centro activo da β -lactamase e as carbapenemases da classe B, denominadas metalo- β -lactamases, apresentam ião zinco (Cornaglia *et al*, 2011). Estas enzimas são codificadas em plasmídeos que apresentam frequentemente genes de resistência aos antibióticos não β -lactâmicos como fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, podendo estar associados a outros mecanismos de resistência como diminuição da permeabilidade da membrana externa e bombas de efluxo (Stuart *et al*, 2010; Papp-Wallace, 2011; Birgy *et al*, 2012; Nordmann *et al*, 2012a; Cantón *et al*, 2012; Bush, 2013b).

Nos últimos anos, *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases têm vindo a aumentar de forma alarmante. Este grupo de β -lactamases é relevante na prestação de cuidados de saúde pelos desafios que apresenta a nível terapêutico, deteção laboratorial e medidas de prevenção (Stuart *et al*, 2010; Drawz *and* Bonomo, 2010; Nordmann *et al*, 2011b; Papp-Wallace, 2011; Birgy *et al*, 2012; Bush, 2013b; Seiffert *et al*, 2013). *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases surgiram de forma preocupante a partir de 2011 em diferentes países da Europa (Cantón *et al*, 2012) (Figura 9). Nos países nórdicos, na Suíça, na Alemanha e na República Checa a prevalência de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases é menor, contrariamente à Grécia, Itália, Turquia e Israel com taxas de prevalência elevadas (Cantón *et al*, 2012). Diversos fatores têm sido descritos como responsáveis pela prevalência elevada de carbapenemases como relações históricas e culturais, migração, viagens e turismo médico (Cantón *et al*, 2012).

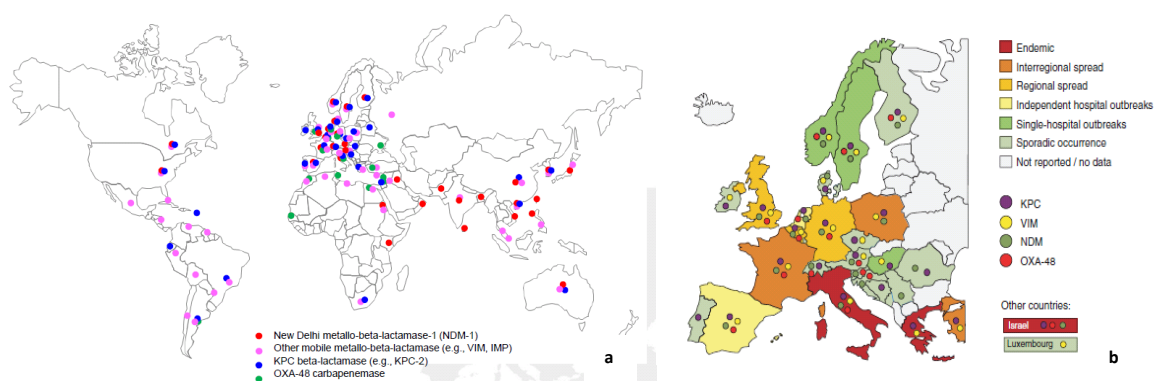


Figura 9 - Distribuição de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases no Mundo (a) e na Europa (b) (*adaptado de a - ECDC, 2011; b - Cantón et al, 2012*).

As carbapenemases clinicamente mais importantes em *Enterobacteriaceae* são da classe A, representadas pelas carbapenemases do tipo KPC, as metalo- β -lactamases, representadas por VIM, IMP e NDM e as carbapenemases da classe D, designadamente OXA-48 (Tzouvelekis *et al*, 2012).

2.3.1 - Carbapenemases da classe A

As carbapenemases da classe A são codificadas em cromossomas, como são exemplo as NmcA (not metalloenzyme carbapenemase), SME (*Serratia marcescens* enzyme) e IMI-1 (imipenemo-hydrolysing beta-lactamase), ou em plasmídeos, como as KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), IMI-2 e GES (Guiana extended spectrum) (Drawz and Bonomo, 2010; Grundmann *et al*, 2010; Walsh, 2010; Bush, 2011; Nordmann *et al*, 2011b; Hara *et al*, 2013). Estas carbapenemases apresentam elevada capacidade de hidrólise de todos os antibióticos β -lactâmicos incluindo penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemos (Cuzon *et al*, 2010) e diminuição da suscetibilidade aos inibidores clássicos das β -lactamases como ácido clavulânico e tazobactam (Bush, 2011; Pitout, 2012d; Tzouvelekis *et al*, 2012; Van der Bij and Pitout, 2012; Rise, 2012; Bush, 2013b).

KPC é a carbapenemase da classe A mais importante nos cuidados de saúde e emergente em todo o Mundo, identificada em 1996 num isoaldo de *Klebsiella pneumoniae* na Carolina do Norte, Estados Unidos da América, disseminou-se rapidamente nos Estados Unidos da América e posteriormente, em todo o Mundo (Babic *et al*, 2006; Cuzon *et al*, 2010; Grundmann *et al*, 2010; Walsh, 2010; Nordmann *et al*, 2011b; Pitout, 2012d; Bush, 2013b; Hara *et al*, 2013; Munoz-Price *et al*, 2013). Genes

*bla*_{KPC} são encontrados frequentemente em *Klebsiella pneumoniae* (Cuzon *et al*, 2010; Miriagou *et al*, 2010; Pitout, 2012d; Tzouvelekis *et al*, 2012), em outras espécies da família *Enterobacteriaceae* como *Escherichia coli* e outros bacilos de Gram negativo como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (Grundmann *et al*, 2010; Miriagou *et al*, 2010; Walsh, 2010; Nordmann *et al*, 2011b; Van der Bij and Pitout, 2012; Bush, 2013b; Hara *et al*, 2013). Mais de 10 variantes identificadas, de KPC-2 a KPC-13 foram descritas (Van der Bij and Pitout, 2012; <http://www.lahey.org/studies>). KPC-2 e KPC-3 são as carbapenemases prevalentes em todo o mundo e clinicamente significativas, com diferença num aminoácido (His272 → Tyr) (Walsh, 2010; Pfeifer *et al*, 2010; Bush, 2011; Van der Bij and Pitout, 2012; Bush, 2013; Bush, 2013b). KPC-2 foi descrita em 2001 em *Klebsiella pneumoniae* na Carolina do Norte e KPC-3 em *Klebsiella pneumoniae* em isolados nosocomiais no norte dos Estados Unidos da América e em Israel (Curiao *et al*, 2010; Pfeifer *et al*, 2010).

Enterobacteriaceae produtoras de KPC são consideradas endêmicas em alguns países como no sul dos Estados Unidos da América, Porto Rico, Colômbia, Grécia, Israel e China (Curiao *et al*, 2010; Hirsch and Tam, 2010; Pitout, 2012d; Van der Bij and Pitout, 2012). Na Europa, *Enterobacteriaceae* produtoras de KPC têm sido descritas (Pfeifer *et al*, 2010) frequentemente em infeções hospitalares como em França, Suécia, Noruega, Escócia e Polónia, e em outros países como Brasil, China e Israel (Leavitt *et al*, 2007; Hirsch and Tam, 2010; Van der Bij and Pitout, 2012). Em Portugal, descrições de *Enterobacteriaceae* produtoras de KPC são poucas. KPC-3 foi a primeira carbapenemase da classe A descrita em Portugal em 2009 em *Klebsiella pneumoniae* num hospital da região centro, do grupo clonal ST11 (Machado *et al*, 2010; da Silva and Duarte, 2011) e recentemente, *Enterobacteriaceae* produtoras de KPC-2 em amostras ambientais na região norte de Portugal (Poirel *et al*, 2012; Cecílio *et al*, 2013).

A localização dos genes *bla*_{KPC} em plasmídeos transferíveis IncFII e associados ao transposição Tn4401 em diferentes espécies de bacilos de Gram negativo, explicam a rápida e alarmante disseminação em todo o Mundo particularmente no ambiente dos cuidados de saúde (Drawz and Bonomo, 2010; Hirsch and Tam, 2010; Pfeifer *et al*, 2010; Nordmann *et al*, 2011b; Pitout, 2012d; Rise, 2012; Tzouvelekis *et al*, 2012; Van der Bij and Pitout, 2012). Plasmídeos que codificam o gene *bla*_{KPC} podem apresentar genes que codificam as β -lactamases *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-11}, *bla*_{SHV-12} e em menor frequência as β -lactamases *bla*_{OXA} e *bla*_{CTX-M}, bem como genes que codificam resistência às fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, sulfonamidas e tetraciclinas (Pitout, 2012d; van der Bij and Pitout, 2012; Bush, 2013b).

2.3.2 – Metallo- β -lactamases - MBLs

As MBLs caracterizam-se pela hidrólise de todos os antibióticos β -lactâmicos, exceto os monobactâmicos, resistência aos inibidores das β -lactamases e suscetibilidade a agentes quelantes como o EDTA (Helfand *and* Bonomo, 2005; Queenan *and* Bush, 2007; Maltezou, 2009; Drawz *and* Bonomo, 2010; Pfeifer *et al*, 2010; Bush, 2011; Cornaglia *et al*, 2011; Nordmann *et al*, 2011b; Tzouvelekis *et al*, 2012; Rise, 2012; Nordmann *and* Poirel, 2013). Inicialmente descritas em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp, rapidamente foram identificadas em *Enterobacteriaceae* (Babic *et al*, 2006; Drawz *and* Bonomo, 2010; Walsh, 2010; Pitout, 2012d) com implicações epidemiológicas e clínicas significativas (Cornaglia *et al*, 2011).

As principais classes de MBLs são IMP, VIM, SPM, GIM, SIM (Cornaglia *et al*, 2011) e recentemente as NDM (Pfeifer *et al*, 2010). As MBLs do tipo VIM (Verona integron-encoded metallo- β -lactamase), IMP e recentemente as NDM (New Delhi metallo- β -lactamase) são as MBLs clinicamente relevantes em *Enterobacteriaceae*, associadas a infeções e surtos em unidades de prestação de cuidados de saúde (Maltezou, 2009; Bush, 2011; Nordmann *et al*, 2011b; Tzouvelekis *et al*, 2012; Bush, 2013b).

i) Metallo- β -lactamases do tipo IMP e VIM

As MBLs do tipo IMP descritas pela primeira vez num isolado de *Serratia marcescens* em 1991 no Japão, e as MBLs do tipo VIM descritas em Verona, em 1999, em *Pseudomonas aeruginosa* são as MBLs mais prevalentes em todo o Mundo (Livermore *and* Woodford, 2000; Babic *et al*, 2006; Maltezou, 2009; Walsh, 2010; Bush, 2011; Nordmann *et al*, 2011b), com mais de 42 variantes IMP e 37 variantes de VIM (Bush, 2013b). Descritas inicialmente em *Pseudomonas aeruginosa* e em *Acinetobacter baumannii* e em *Enterobacteriaceae* (Pfeifer *et al*, 2010). MBLs do tipo VIM e IMP são actualmente frequentes em *Pseudomonas aeruginosa*, em *Acinetobacter baumannii* e em *Klebsiella pneumoniae* (Miriagou *et al*, 2010).

As MBLs do tipo IMP e VIM encontram-se disseminadas na Europa, América do Sul e Estados Unidos da América onde são responsáveis por infeções hospitalares (Maltezou, 2009; Cuzon *et al*, 2010; Nordmann *et al*, 2011b; Vaux *et al*, 2011) e endémicas na Grécia, Taiwan e Japão (Nordmann *et al*, 2011b). Os genes *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM} encontram-se amplamente disseminados à semelhança de outras β -lactamases, em genes cromossómicos ou associados a elementos genéticos móveis em cassetes de genes, em integrões, plasmídeos e transposões (Helfand *and* Bonomo, 2005; Maltezou, 2009; Drawz *and* Bonomo, 2010; Bush, 2011; Tzouvelekis *et al*, 2012; Bush, 2013b).

ii) Metallo- β -lactamases do tipo NDM

A recente MBL do tipo NDM-1 (New Delhi Metallo- β -lactamase) foi identificada em 2008 na Suécia em isolados de *Klebsiella pneumoniae* e de *Escherichia coli* num doente transferido de um hospital de New-Delhi - Índia (Nordmann *et al*, 2011a; Pitout, 2012d). Estas MBLs são prevalentes em *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (Grundmann *et al*, 2010; Nordmann *et al*, 2011a) e caracterizam-se pela elevada resistência aos carbapenemos (Hara *et al*, 2013). Plasmídeos que albergam genes *bla*_{NDM-1} são diversos e podem conferir fenótipo de multirresistência e/ou panresistência aos antibióticos, devido à presença de outros genes de resistência aos carbapenemos como *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, genes que codificam cefalosporinases, ESBLs, resistência aos aminoglicosídeos, macrólidos, rifampicina e trimetoprim-sulfametoxazol (Grundmann *et al*, 2010; Nordmann *et al*, 2011a; Hara *et al*, 2013).

Infeções por *Enterobacteriaceae* produtoras de NDM têm sido descritas em unidades hospitalares e na comunidade (Nordmann *et al*, 2011a, Nordmann *et al*, 2011b; Vaux *et al*, 2011; Pitout, 2012d; Bush, 2013b; Hara *et al*, 2013; Wellington *et al*, 2013) e como colonizadoras do trato intestinal de pessoas com história de viagens a países endémicos como Índia e Paquistão (Nordmann *et al*, 2011b; Vaux *et al*, 2011; Pitout, 2012d; Bush, 2013b; Hara *et al*, 2013; Wellington *et al*, 2013).

2.2.3 – Carbapenemases da classe D

As carbapenemases da classe D incluem um número pequeno de β -lactamases com capacidade de hidrólise dos carbapenemos (Pfeifer *et al*, 2010), como são exemplo as β -lactamases OXA-23, OXA-24, OXA-40 e OXA-58 frequentes em *Acinetobacter baumannii* (Miriagou *et al*, 2010; Walsh, 2010; Rise, 2012; Hara *et al*, 2013) e OXA-48 em *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (Grundmann *et al*, 2010; Miriagou *et al*, 2010). Estas enzimas hidrolisam os carbapenemos em níveis reduzidos e não são inibidas pelos inibidores utilizados na clínica (Poirel *et al*, 2012c; Nordmann and Poirel, 2013).

Isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de OXA-48 podem expressar diversas β -lactamases incluindo ESBLs da classe A e alteração da permeabilidade da membrana externa (Poirel *et al*, 2011a; Poirel *et al*, 2012c). As β -lactamases OXA-48 foram identificadas na Turquia em 2001 num surto de *Klebsiella pneumoniae*, e desde então têm vindo a emergir de forma significativa em todo o Mundo associadas a surtos em unidades hospitalares em *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (Miriagou *et al*,

2010; Nordmann *et al*, 2011b; Poirel *et al*, 2011a; Pitout, 2012d; Poirel *et al*, 2012c; Tzouveleakis *et al*, 2012). Na Europa, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* produtoras de OXA-48 tem vindo a aumentar, particularmente em França, Alemanha, Espanha, Inglaterra e Holanda associado à transferência de doentes de países endémicos (Pfeifer *et al*, 2010).

2.4 – Enterobacteriaceae resistentes aos antibióticos não β -lactâmicos

Enterobacteriaceae podem adquirir resistência aos antibióticos não β -lactâmicos, compreendendo vários grupos de antibióticos, que actuam como inibidores de síntese proteica, inibidores da síntese dos ácidos nucleicos e antibióticos antimetabolitos. Quinolonas e aminoglicosídeos representam opções terapêuticas frequentemente utilizadas no tratamento de infeções por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs, no entanto é comum apresentarem elevada resistência a estes antibióticos em associação com a produção de ESBLs (Lupo *et al*, 2013).

Os mecanismos de resistência às quinolonas em *Enterobacteriaceae* envolvem mutações em genes codificadores dos locais de ação deste grupo de antibióticos: subunidades da DNA girase (*gyrA* e *gyrB*) e topoisomerase IV (*parC* e *parE*) (Smith and Baker, 2002; Rodríguez-Martínez *et al*, 2011; Rice, 2012; Lupo *et al*, 2013). Relativamente aos genes cromossómicos, é necessário que ocorra pelo menos uma mutação na região determinante de resistência às quinolonas (QRDR) de *gyrA*, que interage com o DNA, verificando-se que mutações adicionais em *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* contribuem para o aumento da resistência (Pitout, 2008). Genes associados a resistência a quinolonas mediada por plasmídeos são do tipo *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrVC* e enzima *aac(6')-Ib-cr* variante do gene *aac(6')-Ib* que codifica a enzima aminoglicosídeo-acetiltransferase, sendo responsável pela redução da suscetibilidade à ciprofloxacina (Smith and Baker, 2002; Jana and Deb, 2006; Alekshun and Levy, 2007; Rodríguez-Martínez *et al*, 2011; Lupo *et al*, 2013). Sistema de efluxo mediado por plasmídeos, *qepA* pode explicar resistência a este grupo de antibióticos (Lupo *et al*, 2013).

A resistência aos aminoglicosídeos em bacilos de Gram negativo é mediada por genes que codificam as enzimas acetiltransferases (*aac(6')*), nucleotídltransferases (*ant 4'*) e fosfotransferase (*aph(3')*). Os genes *aadAI* (*aadAI* e *aadA5*) são responsáveis pela resistência à estreptomicina; os genes *aac(3)-IV* à gentamicina e os genes *aphAI* à canamicina (Jana and Deb, 2006).

Enterobacteriaceae produtoras de ESBLs podem apresentar resistência a outras classes de antibióticos não β -lactâmicos, como tetraciclina (*tet(A)*, *tet(B)* e *tet(G)*), fenicóis

(*catA*, *floR* e *cmlAI*), sulfonamidas (*sulI*, *sul2* e *sul3* e trimetoprim (*dfrAI*, *dfrAU* e *dfrAIT*) (Lupo *et al*, 2013).

2.5 – Mecanismos de disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e de carbapenemases

Enterobacteriaceae podem apresentar resistência intrínseca e/ou resistência adquirida aos antibióticos alterando o perfil de suscetibilidade nativo aos antibióticos (Aleksun *and* Levy, 2007; Cox *and* Wright, 2013). As β -lactamases podem ser codificadas em cromossomas ou em elementos genéticos móveis como plasmídeos e transposições (Mulvey *and* Simor, 2009). A resistência intrínseca aos antibióticos corresponde às características fenotípicas naturais inerentes a uma espécie bacteriana, presente em genes cromossômicos, resultando em ausência de actividade dos antibióticos, transmitida verticalmente de geração em geração (Aleksun *and* Levy, 2007). A resistência adquirida aos antibióticos é resultado da alteração do genótipo como consequência da aquisição de novos genes de resistência aos antibióticos por transmissão horizontal, a partir de bactérias que coabitam o mesmo ambiente, mediado por elementos genéticos móveis e/ou mutações nos genes alvo da ação do antibiótico (Aleksun *and* Levy, 2007; Allen *et al*, 2010; Cox *and* Wright, 2013).

A mobilização de genes de resistência aos antibióticos apresenta um papel fundamental na adaptação bacteriana, disseminação e persistência de genes de resistência aos antibióticos em diferentes espécies bacterianas e acumulação em clones multirresistentes aos antibióticos, representando um problema mundial inerente ao tratamento de infeções e aplicação de medidas de controlo de infeção. Os principais mecanismos de disseminação de ESBLs e de carbapenemases em *Enterobacteriaceae* envolvem mobilização de elementos genéticos em plasmídeos, transposições, integrões e sequências de inserção (IS) albergando genes *bla*_{ESBLs} e/ou carbapenemases, e em alguns casos, bacteriófagos (Figura 10).

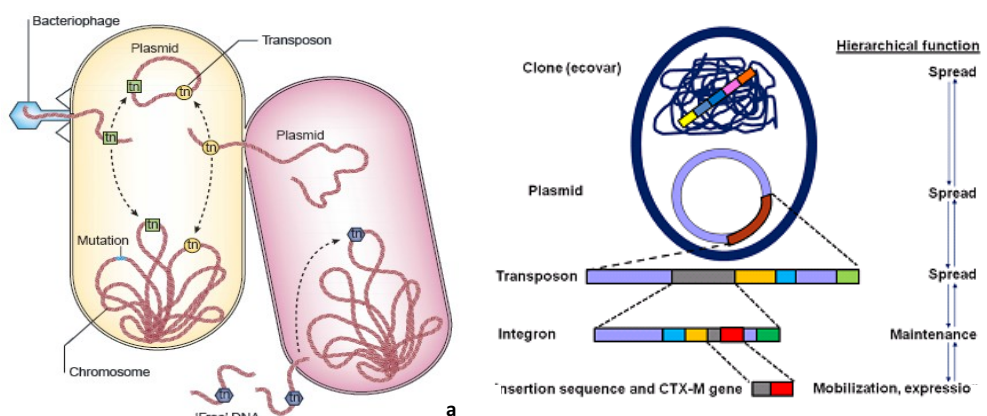


Figura 10 - Elementos genéticos de aquisição e de transferência de genes de resistência aos antibióticos (a - Levy and Marshall, 2004; b - Cantón *et al*, 2012)

2.5.1 - Plasmídeos

Descritos em 1963, por Mitsuhashi Watanabe, em isolados multirresistentes de *Shigella flexneri* no Japão, os plasmídeos são elementos genéticos móveis transferíveis constituídos por DNA extra-cromossômico, de cadeia dupla circular ou linear, com capacidade de replicação autônoma localizados no cromossoma bacteriano (Carattoli, 2009; Carattoli, 2011; Beceiro *et al*, 2012; Carattoli, 2013; El Salabi *et al*, 2013). Na região variável do plasmídeo localizam-se genes responsáveis pelas funções adaptativas, nomeadamente genes que codificam resistência aos antibióticos, factores de virulência (Beceiro *et al*, 2012) e produção de bacteriocinas, característica que facilita a disseminação bem-sucedida dos plasmídeos entre diferentes espécies bacterianas de origens geográficas diferentes (Carattoli, 2009; Carattoli, 2011; Carattoli, 2013; El Salabi *et al*, 2013).

Em bacilos de Gram negativo o mecanismo de transferência horizontal prevalente responsável pela transferência de genes de resistência aos antibióticos em bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes e o processo de conjugação (Carattoli, 2011; Beceiro *et al*, 2012; Carattoli, 2013). Estes elementos genéticos móveis podem conferir resistência às principais classes de antibióticos nomeadamente aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, sulfonamidas, macrólidos, quinolonas e trimetoprim, que podem estar contidos no mesmo plasmídeo (Carattoli, 2013). Os plasmídeos dos grupos IncFII, IncA/C, IncL/M, IncN e Inc11 estão associados a epidemias de *Enterobacteriaceae* multirresistentes aos antibióticos (Carattoli, 2011). Os plasmídeos IncF, amplamente distribuídos em *Enterobacteriaceae*, transportam genes responsáveis

pela resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos como aminoglicosídeos, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol e fluoroquinolonas, fatores de virulência como hemolisinas, invasinas e toxinas, e encontram-se associados ao clone pandêmico e virulento de *Escherichia coli* O25b-ST131 (Beceiro *et al*, 2012).

2.5.2 - Transposições

Elementos genéticos móveis constituídos por DNA com duas sequências de inserção (IS) com capacidade de replicação e inserção no genoma, através do mecanismo de transposição que envolve a transferência de segmentos, no cromossoma ou em plasmídeos (El Salabi *et al*, 2013).

2.5.3 - Integrões

Os integrões são estruturas genéticas não transmissíveis com capacidade de capturar e integrar vários genes de resistência aos antibióticos (Cantón *and* Ruiz-Garbajosa, 2011; Beceiro *et al*, 2012; El Salabi *et al*, 2013), podem estar associados a transposições e/ou plasmídeos e ao cromossoma em grandes arranjos de cassetes de genes (Cantón *and* Ruiz-Garbajosa, 2011). São constituídos por três elementos: o gene de integrase *intI* que codifica a enzima integrase responsável pela integração dos genes; o local de recombinação do integrão com as cassetes genéticas, *attI* e o promotor (P1) que assegura a expressão do operão (El Salabi *et al*, 2013).

2.5.4 - Sequências de Inserção

As sequências de inserção são considerados elementos genéticos simples transponíveis, sem capacidade de replicação autônoma, que fazem parte do cromossoma ou de plasmídeos, constituídas por sequências curtas de DNA (Saenz, 2004; El Salabi *et al*, 2013).

2.6 – Detecção laboratorial de β -lactamases de Espectro Alargado e de Carbapenemases

A identificação laboratorial de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e de carbapenemases é fundamental na prestação de cuidados de saúde para seleção de

antibióticos adequados ao tratamento e implementação de medidas de controlo de infeção (Pitout *and* Laupland, 2008; Stuart *et al*, 2010; Nordmann *et al*, 2012c).

Os métodos de identificação laboratorial de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e de carbapenemases baseiam-se em métodos de deteção fenotípicos, amplamente utilizados pela execução fácil e custo reduzido, e em métodos genotípicos para deteção de genes de resistência aos antibióticos e identificação de β -lactamases (Pitout *and* Laupland, 2008; Falagas *and* Karageorgopoulos, 2009; Gazin *et al*, 2012).

2.6.1 – Deteção laboratorial de β -lactamases de Espectro Alargado

A deteção laboratorial de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs baseia-se no teste de determinação de suscetibilidade aos oximino- β -lactâmicos pelo método de difusão em agar e/ou pela utilização de sistemas automatizados para determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) (Grundmann *et al*, 2010; Nordmann *et al*, 2012b; Pitout, 2012d). Até 2011, directrizes do CLSI e EUCAST recomendavam a pesquisa de produção de ESBL em *Enterobacteriaceae* em casos de redução da suscetibilidade às cefalosporinas. Os isolados produtores ESBLs eram referidos como resistentes a todas as cefalosporinas (Livermore *et al*, 2012; Nguyen *et al*, 2013). Recentemente, as mesmas organizações alteraram esta situação, com a diminuição dos *breakpoints* das cefalosporinas e dos monobactâmicos e a necessidade de confirmar a deteção de produção de ESBL com ácido clavulânico (Livermore *et al*, 2012; Nguyen *et al*, 2013). Os isolados produtores de ESBLs podem ser suscetíveis às cefalosporinas de terceira e de quarta geração, devendo o resultado ser descrito com os *breakpoints* detetados e isolado produtor de ESBL (Livermore *et al*, 2012). A mesma situação é colocada em relação à redução da suscetibilidade aos carbapenemos em *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases (Livermore *et al*, 2012). No entanto, estas situações têm levantado algumas questões relacionadas com insucesso terapêutico em infeções por isolados produtores de ESBLs (Livermore *et al*, 2012; Nguyen *et al*, 2013).

A confirmação da produção de ESBL pode ser realizada com tiras E-test (cefotaxima/cefotaxima com ácido clavulânico - CT/CTL; ceftazidima/ceftazidima com ácido clavulânico - TZ/TZL e cefepime/cefepime com ácido clavulânico PM/PML). Esta metodologia é opcional na clínica, mas fundamental nos estudos de epidemiologia e implementação de medidas de controlo de infeção (Pitout, 2012d; Willems *et al*, 2013). Outras metodologias de deteção de produtores de ESBL, baseiam-se na utilização de meios de cultura cromogénicos que permitem a deteção rápida e presuntiva de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs (Willems *et al*, 2013).

Métodos moleculares como PCR, PCR em tempo real e sequenciação, permitem a detecção de genes codificadores de ESBLs, e são alternativas vantajosas para os laboratórios clínicos, no entanto apresentam custos elevados e requerem profissionais especializados (Nordmann *et al*, 2012b; Pitout, 2012d). Outros métodos de detecção molecular incluem *microarray* e metodologia de espectrometria de massa, como Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) (Nordmann *et al*, 2012b; Pitout, 2012d; Lupo *et al*, 2013). Esta última metodologia, ainda em desenvolvimento, permite a identificação bacteriana e detecção de mecanismos de resistência aos antibióticos (Lupo *et al*, 2013).

2.6.2 – Detecção laboratorial de Carbapenemases

A heretogeneidade da expressão de resistência aos carbapenemos dificulta a detecção laboratorial de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases por métodos fenotípicos (Grundmann *et al*, 2010). Os métodos moleculares considerados *gold standards* permitem a detecção de genes codificadores de carbapenemases (Birgy *et al*, 2012; Gazin *et al*, 2012; Leavy *et al*, 2013; Nordmann and Poirel, 2013; Willems *et al*, 2013). Os métodos moleculares como é caso do PCR, permitem a detecção de genes codificadores de carbapenemases em isolados com redução da suscetibilidade aos carbapenemos, que os métodos fenotípicos podem não conseguir detetar (Nordmann and Poirel, 2013).

Diferentes testes de detecção e/ou confirmação de produção de carbapenemases têm sido descritos e aplicados na detecção de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases (Pitout, 2012d). No entanto, nenhum apresenta 100% de especificidade e sensibilidade (Nordmann and Poirel, 2013). Nos métodos fenotípicos, o ertapenemo é considerado um indicador fundamental na detecção da maior parte de carbapenemases (Nordmann and Poirel, 2013). Os testes empregues actualmente pelos laboratórios consistem: i) Teste de Hodge modificado: utilizado durante vários anos, baseia-se na detecção *in vitro* da produção de carbapenemases (Nordmann *et al*, 2011b; Nordmann and Poirel, 2013). É recomendado na detecção de KPC e OXA-48, no entanto apresenta baixa especificidade em isolados co-produtores de AmpC (Nordmann *et al*, 2011b). ii) Teste de inibição de carbapenemases: baseia-se na inibição pelo tazobactam, ácido clavulânico e ácido borónico para detecção de carbapenemases da classe A e na inibição com EDTA para detecção de MBLs (Nordmann *et al*, 2011b; Nordmann and Poirel, 2013). iii) E-test MBLs: A detecção de produtores de MBLs pode ser realizada através da inibição da actividade destas enzimas pela ação do EDTA. Tiras de E-test utilizando imipenemo e

imipenemo com EDTA são eficientes na detecção de produtores de MBLs com elevada resistência ao imipenemo, no entanto podem não detetar produção de MBLs em níveis reduzidos (Nordmann *et al*, 2011c). iv) Ensaio espectrofotométrico: permite a detecção e diferenciação de produtores de carbapenemases de não produtores de carbapenemases. No entanto é um método moroso não sendo fácil a discriminação dos diferentes tipos de carbapenemases (Nordmann *et al*, 2011b; Nordmann and Poirel, 2013). v) Teste Carba NP: teste bioquímico que permite a identificação de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases pela hidrólise do imipenemo *in vitro* através da viragem do indicador de pH (Nordmann and Poirel, 2013). vi) Teste Blue-CARBA: é um teste bioquímico recente modificado do teste Carba NP, que permite a detecção de carbapenemase directamente de culturas (Pires *et al*, 2013).

3 – *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, das ESBLs às carbapenemases na prestação de cuidados de saúde

A introdução das oximino-cefalosporinas, como cefotaxima e ceftazidima, no início de 1980, como terapêutica para diminuição da incidência de infeções por *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases, coadjuvou ao aparecimento de isolados produtores de ESBLs, que se tornaram a principal causa de infeções em unidades hospitalares (Figura 11) (Bonnet, 2004; Livermore, 2009; Grundmann *et al*, 2010; Dhillon and Clark, 2012; Rice, 2012). Nos últimos anos, mudanças epidemiológicas significativas ocorreram substituindo a prevalência de isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs do tipo TEM e SHV associada a clones epidémicos em unidades hospitalares (Cantón and Coque, 2006; Pitout, 2009; Tzouveleakis *et al*, 2012), pelo aumento alarmante de isolados de *Escherichia coli* produtora de ESBL do tipo CTX-M relacionados com infeções em unidades hospitalares e na comunidade (Bonnet, 2004; Pitout *et al*, 2005; Cantón and Coque, 2006; Coque *et al*, 2008a; Rogers *et al*, 2011). Estas alterações epidemiológicas sentidas em todo o Mundo tornaram-se progressivamente mais complexas e limitaram a fronteira entre as unidades hospitalares e a comunidade (Pitout *et al*, 2005; Paterson, 2006; Pitout and Laupland, 2008; Chong, 2011; García-Hernández *et al*, 2011; Dhillon and Clark, 2012; Wellington *et al*, 2013).

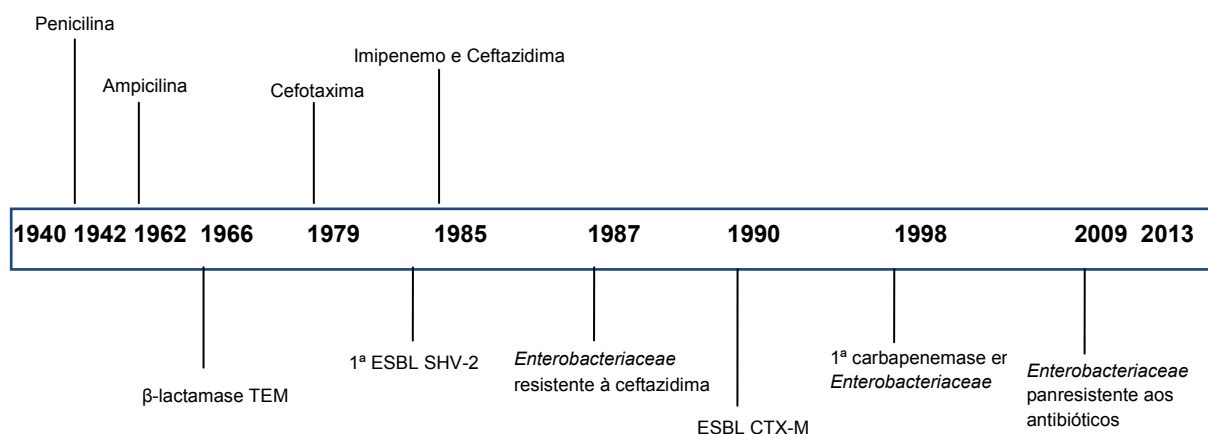


Figura 11 - Evolução temporal da utilização de diferentes classes de antibióticos β -lactâmicos na clínica e aparecimento de β -lactamases em *Enterobacteriaceae* (*adaptado* de Rice, 2012 e CDC, 2013).

Escherichia coli produtora de CTX-M na comunidade foi descrita em 1988 numa amostra de urina de um idoso sem história de internamento hospitalar próxima da data de deteção (Pitout *et al*, 2005). O aumento e disseminação alarmante destas enzimas particularmente em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* têm sido observados desde o início do século em infeções da comunidade (Livermore, 2012; Nordmann *and* Cornaglia, 2012). Estudos referem que o aumento de ESBLs do tipo CTX-M em unidades hospitalares pode ser reflexo da predominância destas enzimas na comunidade, com consequente disseminação e emergência em nichos nosocomiais (Cantón *and* Coque, 2006). O cenário epidemiológico actual de *Enterobacteriaceae* produtoras de CTX-M inclui o aparecimento de variantes novas, existência de múltiplos clones multirresistentes aos antibióticos e elementos genéticos móveis responsáveis por albergarem genes que codificam ESBLs do tipo CTX-M (Cantón *and* Coque, 2006).

A introdução na clínica do primeiro carbapenemo, o imipenemo em 1985, levou à utilização dos carbapenemos como terapêutica de eleição no tratamento de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs em instituições de prestação de cuidados de saúde hospitalares (Cuzon *et al*, 2010; Grundmann *et al*, 2010; Nordmann *and* Cornaglia, 2012; Hara *et al*, 2013). *Enterobacteriaceae* produtora de carbapenemase descrita em 2008, como resultado da utilização de carbapenemos, condicionou o aparecimento e emergência em a nível mundial particularmente na Europa, Índia e nos Estados Unidos da América (Cuzon *et al*, 2010; Grundmann *et al*, 2010; Walsh, 2010; Gupta *et al*, 2011; Vaux *et al*, 2011; Gazin *et al*, 2012; Glasner *et al*, 2013; Magiorakos *et al*, 2013). O

aparecimento e disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases em diferentes nichos, como os cuidados de saúde e comunidade, têm ocorrido de forma rápida (Grundmann *et al*, 2010; Glasner *et al*, 2013).

O sector dos cuidados de saúde representa um nicho relevante no aparecimento e disseminação de *Enterobacteriaceae* multirresistentes e panresistentes aos antibióticos (Nordmann *and* Cornaglia, 2012). Infecções associadas aos cuidados de saúde em unidades hospitalares e na comunidade, por bacilos de Gram negativo multirresistentes aos antibióticos são importantes indicadores negativos de qualidade, associados ao aumento da mortalidade, morbilidade, internamentos múltiplos e prolongados, aumento dos custos inerentes aos cuidados de saúde e opções terapêuticas limitadas, constituindo um risco para a segurança dos doentes na prestação de cuidados de saúde em todo o Mundo. (March *et al*, 2009; Jernberg *et al*, 2010; Theuretzbacher, 2011; Lautenbach *et al*, 2012; Tinelli *et al*, 2012; Suetens, 2012; Tzouveleakis *et al*, 2012; Mammina, 2013; Marchaim *et al*, 2013; Nordmann *and* Poirel, 2013; Willems *et al*, 2013).

As instituições de prestação de cuidados de saúde na comunidade e hospitalares apresentam um papel fundamental como reservatórios e na disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs em clones multirresistentes aos antibióticos e virulentos como o clone de *Escherichia coli* O25b-ST131 e de carbapenemases, contribuindo para o aumento significativo de infeções neste sector e para o cenário epidemiológico actual, complexo e dinâmico (Paterson *and* Bonomo, 2005; Cantón *and* Bryan, 2012; Bush, 2013c; Mammina, 2013). Um conjunto sinérgico de fatores tem sido descrito como responsável no aparecimento e disseminação de *Enterobacteriaceae* multirresistentes aos antibióticos, onde se inclui política das instituições de prestação de cuidados de saúde inerente à redução de custos relacionados com os materiais/equipamentos de cuidados de saúde, dados demográficos com aumento da população mais idosa e crónica, condições das instituições com elevado número de procedimentos médico invasivos realizados com a prestação de cuidados de saúde, utilização inadequada dos antibióticos, viagens internacionais, transferências de doentes entre diferentes países e entre diferentes instituições no mesmo país (Mammina, 2013). Neste sentido, bactérias multirresistentes aos antibióticos deixaram de estar confinadas ao ambiente hospitalar emergindo de forma significativa na comunidade, particularmente em instituições que proporcionam internamentos de longa duração direcionadas à prestação de cuidados de saúde aos mais idosos e/ou dependentes (Mammina, 2013). A transferência deste grupo da população entre os cuidados hospitalares e cuidados na comunidade contribui na disseminação das bactérias multirresistentes aos antibióticos, representando provavelmente o maior reservatório na rede de prestação de cuidados de saúde (Paterson *and* Bonomo, 2005; Ami *et al*, 2006; MacPherson *et al*, 2009; Andersson

and Hughes, 2012; Mammina, 2013; Marchaim *et al*, 2013). Neste grupo de risco da população identificam-se diversos fatores de risco inerentes ao desenvolvimento de infecção e/ou colonização intestinal por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e de carbapenemases, que compreendem idade avançada, nomeadamente superior a 65 anos, estado clínico grave e co-morbilidades como doença renal, doenças cardiovasculares e demência, internamentos prolongados e/ou múltiplos de forma permanente ou por pequenos períodos em unidades de prestação de cuidados de saúde, presença de dispositivos invasivos como cateteres, sonda e ventilação, e consequentemente execução de procedimentos invasivos de diagnóstico e/ou tratamento como entubação, ventilação, sonda vesical e/ou arterial, sonda nasogástrica, tubos de gastrostomia ou jejunostomia, administração parentérica, cirurgia recente, hemodiálise, úlceras de decúbito e estado nutricional débil e utilização frequente e recente de antibióticos (Paterson and Bonomo, 2005; Peirano and Pitout, 2010; Cantón and Bryan, 2012; Tinelli *et al*, 2012; Marchaim *et al*, 2013; Chandra, 2013).

O aparecimento de *Enterobacteriaceae* panresistentes aos antibióticos, devido à associação de β -lactamases com determinantes de resistência aos antibióticos não β -lactâmicos, como verificado recentemente com as β -lactamases do tipo NDM, pode estar associado à disseminação através de elementos genéticos móveis, contribuindo para a emergência destes isolados (Gazin *et al*, 2012; Walsh and Toleman, 2012; Bush, 2013c; Nordmann and Poirel, 2013). Isolados de *Enterobacteriaceae* multirresistentes e panresistentes aos antibióticos levantam sérias questões no sector dos cuidados de saúde, inerentes à rápida disseminação, mortalidade e insucesso terapêutico (Johnson and Woodford, 2013).

3.1 – Clone virulento de *Escherichia coli* produtora de CTX-M-15 do grupo clonal O25b-ST131 multirresistentes aos antibióticos

Clones de *Enterobacteriaceae* multirresistentes aos antibióticos e virulentos presentes em diferentes nichos têm sido descritos em todo o Mundo como causa importante de disseminação de resistência aos antibióticos e de fatores de virulência. *Escherichia coli* produtora de CTX-M-15 do grupo clonal pandémico e virulento O25b-ST131, descrito pela vez em 2008 em isolados urinários de *Escherichia coli* produtores de CTX-M-15, é um exemplo actual de disseminação rápida e bem sucedida da combinação de resistência aos antibióticos e fatores de virulência, que contribui de forma significativa para o aumento da resistência aos antibióticos em todo o Mundo com impacto significativo em unidades de prestação de cuidados de saúde (Johnson and Stell,

2000; Peirano *and* Pitout, 2010; Chong *et al*, 2011; Platell *et al*, 2011; Rogers *et al*, 2011; Gilbreel *et al*, 2012; Hilty *et al*, 2012; Novais *et al*, 2012; Banerjee *and* Johnson, 2013; Chandra, 2013; Lautenbach, 2013; López-Cerero *et al*, 2013a; López-Cerero *et al*, 2013b; Olesen *et al*, 2013).

Escherichia coli produtora de CTX-M-15 do grupo clonal O25b-ST131 tem sido descrita nos cuidados de saúde em infeções na comunidade (Pitout, 2009; D'Andrea *et al*, 2013; Doi *et al*, 2013), como colonizadora do trato intestinal de residentes de instituições de prestação de cuidados de saúde, como lares de idosos, Unidades de Cuidados Continuados Integrados (UCCI) (Pitout, 2009; Rogers *et al*, 2011; Banerjee *and* Johnson, 2013) e em unidades hospitalares, tornando-se um dos maiores desafios à clínica e comissões de controlo de infeção (Peirano *and* Pitout, 2010; Chong *et al*, 2011; Platell *et al*, 2011; Hilty *et al*, 2012; Novais *et al*, 2012; Banerjee *and* Johnson, 2013; Dahdi *et al*, 2013). Este grupo clonal tem sido descrito em animais domésticos e não domésticos (Pitout, 2009; Rogers *et al*, 2011; D'Andrea *et al*, 2013), e alimentos e água representam potenciais reservatórios (Rogers *et al*, 2011).

Isolados de *Escherichia coli* produtores de CTX-M-15 do grupo clonal ST131 serogrupo O25B:H4 e grupo filogenético B2, apresentam fenótipo de multirresistência a diferentes classes de antibióticos como fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e trimetoprim-sulfametoxazol e diversos fatores de virulência (Banerjee *and* Johnson, 2013). Isolados de *Escherichia coli* não produtores de ESBLs resistentes às fluoroquinolonas tem sido descritos associados a este grupo clonal (Rogers *et al*, 2011). O sucesso de disseminação e persistência deste grupo clonal em diferentes nichos parece estar relacionado com a aquisição de diversos genes de resistência albergando ESBLs do tipo CTX-M-15, carbapenemases (VIM, NDM e KPC) (Morris *et al*, 2011; Peirano *et al*, 2011; Morris *et al*, 2012), cefamicinases (CMY), metilases (AmrA) e enzimas modificadores de quinolonas (Rogers *et al*, 2011; Novais *et al*, 2012). A ESBL do tipo CTX-M-15 é a mais prevalente associada a este grupo clonal, no entanto outras ESBLs da família CTX-M têm sido descritas como CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-27, CTX-M-32 e CTX-M-61, e variantes das β -lactamases do tipo TEM e SHV, designadamente TEM-24, TEM-116, SHV-12, SHV-5 e SHV-7 (Rogers *et al*, 2011).

Este grupo clonal apresenta diversos genes de virulência que apresentam um papel fundamental na colonização e infeção por isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs deste grupo clonal. Os genes de virulência comuns associados a este grupo clonal incluem os *iha* e *fimH* (adesinas), *sat* (toxina), *fyuA* e *iutA* (sideróforos), *kpsMII* (cápsula grupo 2), *usp* (proteína uropatogénica específica), *traT* (resistência ao soro associada), *ompT* (protease da membrana externa) e *malX* (marcador de ilha de

patogenicidade) (Peirano *and* Pitout, 2010; Platell *et al*, 2011; Rogers *et al*, 2011; Lautenbach, 2013).

O ambiente de instituições de prestação de cuidados de saúde à população idosa e/ou dependente, caracterizado pela proximidade dos residentes e falhas nas medidas de controlo de infeção, representam um risco para a instalação bem sucedida e persistência do grupo clonal O25b-ST131 (Lautenbach, 2013). A disseminação deste clone é facilitada pela mobilidade frequente entre as diferentes tipologias de cuidados de saúde e comunidade (March *et al*, 2010).

3.2 – Estratégias de Controlo de Infeção em instituições de prestação de cuidados de saúde à população idosa e/ou dependente

Enterobacteriaceae multirresistentes aos antibióticos emergiram de forma significativa em instituições de prestação de cuidados de saúde em todo o Mundo, onde representam um desafio premente inerente às opções terapêuticas e estratégias de controlo de infeção (Grundmann *et al*, 2010; Mammina, 2013). Nas instituições de cuidados de saúde, particularmente as existentes na comunidade, as medidas de controlo de infeção em muitas situações são ignoradas pela incompreensão do risco inerente à colonização e infeção por bactérias multirresistentes aos antibióticos (Mendelson *et al*, 2005; Ben-Ami *et al*, 2006; Furuya *and* Lowy, 2006; Pelly *et al*, 2006; Rooney *et al*, 2009; Stuart *et al*, 2011), presença de diversos cuidadores de saúde ou *ratio* profissional/doente reduzido (McClean *et al*, 2011; Stuart *et al*, 2011; Hilty *et al*, 2012; Mammina, 2013) e diminuição de custos inerentes à prestação de cuidados (Mammina, 2013).

Estratégias de controlo de infeção são fundamentais nas instituições de prestação de cuidados de saúde particularmente as vocacionadas aos cuidados na população idosa e/ou dependente, de forma a evitar a disseminação de *Enterobacteriaceae* multirresistentes aos antibióticos (Pelly *et al*, 2006; Baquero *et al*, 2011; Stuart *et al*, 2011; Suetens, 2012; Mammina, 2013; Johnson *and* Woodford, 2013). Esforços conjuntos com re-educação da população e do sector dos cuidados de saúde na utilização dos antibióticos e aplicação de medidas de controlo de infeção são imperativos. Em unidades hospitalares medidas de controlo de infeção assentam na prevenção da transmissão doente-doente, colonização de superfícies, mãos dos profissionais e equipamentos médicos, que devem ser aplicadas nas instituições de prestação de cuidados na comunidade (Falagas *and* Karageorgopoulos, 2009).

As principais estratégias de controlo de infeção assentam na vigilância epidemiológica contínua, investigação dos mecanismos de resistência aos antibióticos e deteção precoce de doentes colonizados (Nordmann *et al*, 2011; Glasner *et al*, 2013; Mammina, 2013) através de deteção na pré-admissão em instituições de prestação de cuidados de saúde, sensibilização e formação dos prestadores de cuidados de saúde sobre a aplicação de medidas de controlo de infeção e utilização adequada dos antibióticos (Falagas *and* Karageorgopoulos, 2009) de forma a evitar a transmissão e disseminação nas unidades hospitalares e extra-hospitalares de cuidados de saúde existentes na comunidade (March *et al*, 2009; Heudorf *et al*, 2012; Hilty *et al*, 2012; Tosh *and* McDonald, 2012; Mammina, 2013; Willems *et al*, 2013). A redução da pressão selectiva pela redução do consumo de antibióticos em conjunto com a aplicação de medidas de controlo de infeção de forma interrupta são fundamentais para limitar a disseminação de bacilos de Gram negativo multirresistentes aos antibióticos e clones multirresistentes aos antibióticos como o clone pandémico e virulento de *Escherichia coli* O25b-ST131 (Johnson *et al*, 2009; Schjørring *and* Krogfelt, 2011).

No sentido de prevenir a disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e de carbapenemases em unidades de cuidados agudos aquando de admissão ou aquando da alta hospitalar para unidades de cuidados de saúde específicas é fundamental a deteção de doentes colonizados (Lupo *et al*, 2013; Mammina, 2013; Nordmann *and* Poirel, 2013). A deteção de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e de carbapenemases em grupos de risco, como a população idosa e/ou dependente de cuidados de saúde, na pré-admissão em instituições de prestação de cuidados de saúde, representa uma medida fundamental na deteção precoce de colonização intestinal por bacilos de Gram negativo multirresistentes aos antibióticos (Ben-Ami *et al*, 2006; Nordmann *et al*, 2011; Nordmann *and* Poirel, 2013). Outros grupos de elevado risco, são identificados na população onde deteção de colonização intestinal por *Enterobacteriaceae* multirresistentes aos antibióticos é fundamental, como sendo doentes hospitalizados, doentes provenientes de outros países, doentes internados em unidades de cuidados intensivos, doentes imunodebilitados e potencialmente colonizados (Nordmann *et al*, 2011; Nordmann *and* Poirel, 2013).

Objetivos

O objectivo deste estudo, consistiu na detecção, caracterização e comparação de isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBLs e de carbapenemases responsáveis por colonização fecal de residentes de instituições de prestação de cuidados de saúde extra-hospitalares vocacionadas ao apoio social à população idosa, com isolados responsáveis por infeções do hospital de Braga, de forma a verificar as interações que possam justificar a disseminação destes isolados multirresistentes aos antibióticos que contribuem para a ecologia bacteriana típica desta população, nesta região.

Para o efeito o trabalho foi desenvolvido de acordo com as estratégias seguintes:

- 1** - Detecção de colonização intestinal por *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBLs e carbapenemases, em instituições de prestação de cuidados de apoio social e de cuidados de saúde extra-hospitalares, vocacionados à população idosa e/ou dependente através da detecção e caracterização de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e de carbapenemases como colonizadoras do trato intestinal de residentes de lares de idosos e de UCCI da região Norte de Portugal
- 2** - Caracterização de isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs e de carbapenemases responsáveis por infeções do hospital de Braga
- 3** - Comparação dos isolados responsáveis por colonização intestinal com os responsáveis por infecção provenientes do hospital de Braga, através da avaliação das relações entre os dois tipos de isolados, de forma a detetar interações entre nichos de prestação de cuidados relacionados, como sejam prestação de cuidados de saúde extra-hospitalares, prestação de apoio social e prestação de cuidados agudos hospitalares e avaliação da sua disseminação regional.

O plano de trabalhos foi desenvolvido segundo as seguintes abordagens:

- Seleção de isolados de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e apresentando redução de suscetibilidade aos carbapenemos, responsáveis por colonização fecal de residentes de lares de idosos e de UCCI do distrito de Braga e Porto

A seleção de isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de ESBLs ou apresentando redução de suscetibilidade aos carbapenemos como colonizadores fecais, foi realizada a partir de amostras de fezes de residentes de sete lares de idosos do distrito de Braga e do Porto e de três UCCI do distrito de Braga. Os lares de idosos selecionados apresentam características diferentes ao nível da prestação de cuidados de saúde, sendo desde tradicionais lares de idosos com poucos residentes dependentes de cuidados de saúde, a lares de idosos com características de unidades de internamento. As UCCI, da RNCCI, foram selecionadas pela proximidade com o Hospital de Braga. As UCCI funcionam como unidades de referência na admissão de doentes provenientes do hospital de Braga para continuidade dos cuidados de saúde, e a unidade hospitalar de referência dos doentes institucionalizados em situações de agudização do estado clínico ou tratamentos programados. A seleção de isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs e /ou apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos responsáveis por infeções do hospital de Braga foi feita no período correspondente à recolha de amostras de fezes nas UCCI, provenientes da população geral admitida no hospital e de diferentes serviços de especialidade.

- Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos e caracterização molecular de β -lactamases e genes que codificam resistência aos antibióticos não β -lactâmicos

O fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos foi estudado em isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs e/ou apresentando redução da susceptibilidade aos carbapenemos, do estudo de colonização fecal e de isolados responsáveis por infeções do hospital de Braga. Genes codificadores de β -lactamases da classe A, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} do grupo 1 e da classe D, *bla*_{OXA} foram pesquisados nos isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs, do estudo de colonização fecal e de isolados de infeções do hospital de Braga que apresentavam fenótipo sugestivo de produção de ESBLs avaliado

na caracterização fenotípica. Nos isolados de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* apresentando redução de suscetibilidade aos carbapenemos no estudo de colonização fecal e isolados responsáveis por infeções, foram pesquisados genes codificadores de carbapenemases da classe A, B e D, nomeadamente *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{IMP-22}, *bla*_{NDM} e *bla*_{OXA-48}. Em isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs do estudo de colonização fecal e isolados responsáveis por infeções do hospital de Braga foram pesquisados genes codificadores de resistência aos antibióticos não β-lactâmicos, nomeadamente *aac(6')-Ib-cr*, *acc(3)-IV*, *gyrA*, *qnrA*, *tetA* e *sul1*.

- Caracterização do grupo filogenético, grupo clonal O25b-ST131 e fatores de virulência de isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs provenientes do estudo de colonização fecal e responsáveis por infeções do hospital de Braga

Pela relevância epidemiológica actual de *Escherichia coli* produtora de ESBLs do tipo CTX-M-15 do grupo clonal O25b-ST131 na comunidade e em unidades hospitalares, os isolados de *Escherichia coli* produtores de CTX-M do estudo de colonização fecal e responsáveis por infeções do hospital de Braga foram estudados em relação ao grupo filogenético A, B1, B2 e D e grupo clonal O25b-ST131 por PCR. De forma, a avaliar o potencial patogénico destes isolados, particularmente relacionados com infeções do trato urinário, foram avaliados vinte e dois fatores de virulência por PCR.

- Avaliação das relações epidemiológicas por Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) dos isolados de *Escherichia coli* e dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs e/ou com redução da susceptibilidade aos carbapenemos do estudo de colonização intestinal e de isolados de infeção do hospital de Braga

As relações clonais dos isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs e apresentando redução de suscetibilidade aos carbapenemos provenientes do estudo de colonização fecal e de isolados responsáveis por infeções do hospital de Braga foram estudadas por Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE).

Material e Métodos

1 – Seleção de isolados de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e isolados apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos provenientes de colonização fecal de utentes de instituições de prestação de cuidados de saúde na comunidade

Os isolados estudados foram obtidos a partir do estudo de colonização fecal realizado em utentes de sete lares de idosos do distrito do Porto e Braga, e em doentes internados em três UCCI do distrito de Braga, no período compreendido entre Janeiro de 2008 e Fevereiro de 2012. Os resultados do trabalho de colonização fecal realizado em residentes de seis lares de idosos da região Norte de Portugal em 2008 foram considerados na abordagem experimental do presente estudo, pela relevância dos mesmos (Gonçalves, 2008; Gonçalves *and* Ferreira, 2009). Nesta abordagem experimental é apresentada a caracterização fenotípica dos isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs detetados no estudo de colonização fecal realizado em 2008.

A recolha de amostras de fezes nas instituições de prestação de cuidados de saúde na comunidade, sempre que possível, foi acompanhada das informações individuais dos residentes, como idade, sexo, informação clínica, proveniência antes da admissão na instituição, antibióterapia no momento da recolha das amostras de fezes e/ou dos últimos seis meses e presença de dispositivos médicos invasivos.

1.1 – Caraterização das instituições de apoio social e prestação de cuidados de saúde

As instituições selecionadas no estudo de colonização fecal vocacionadas ao apoio social e de prestação de cuidados de saúde à população idosa e/ou dependente do distrito de Braga e do Porto apresentam características diferentes. As instituições selecionadas representam as principais unidades de apoio social e de prestação de cuidados de saúde a este grupo da população, na região norte de Portugal, geograficamente próximas. A maior parte das instituições pertencem à Santa Casa da Misericórdia locais existindo na mesma instituição outras tipologias de cuidados como os cuidados infantis e unidades hospitalares.

1.1.1 – Lares de Idosos

Em Portugal os lares de idosos, desenvolvidos em contexto de alojamento colectivo, de utilização temporária ou permanente, constituem respostas sociais para pessoas com mais de 65 anos, salvo algumas excepções, em situação de maior risco de perda de independência, que não lhes permite permanecer no seu meio natural de vida (Bonfim *et al*, 1996; Diário da República, 21 de março de 2012). A recolha de amostras de fezes a utentes de lares de idosos, independentes e com diferentes graus de dependência, foi realizada em cinco lares de idosos do distrito do Porto (lares de idosos 1, 2 e 4 localizados no centro do grande Porto, os lares de idosos 5 e 6 localizados na zona costeira a norte do centro do Porto) e dois lares de idosos (lares de idosos 3 e 7) do distrito de Braga, entre Janeiro de 2008 e Março de 2009 (Figura 1). A seleção dos lares de idosos foi realizada de forma aleatória, exceto o lar de idosos 7, selecionado por ser a única instituição a contemplar lar de idosos e UCCI (UCCI 1), também abrangida no estudo de colonização fecal. Os lares de idosos, lar de idosos 3, lar de idosos 5, lar de idosos 6 e lar de idosos 7, e as UCCI, UCCI 1 e UCCI 2, fazem parte de instituições da Santa Casa da Misericórdia locais. Estas instituições apresentam outras valências de cuidados, para além da valência referida e estudada no estudo de colonização fecal, com excepção do lar de idosos 3 que apresenta só lar de idosos. Estas instituições apresentam outras valências de cuidados nomeadamente unidade hospitalar de pequena dimensão e com serviços de especialidade mais utilizados como o caso do lar de idosos 5, lar de idosos 6 e UCCI 2, lar de idosos como é exemplo da UCCI 2 e cuidados infantis como é exemplo o lar de idosos 7, UCCI 1 e a UCCI 2.

Os lares de idosos apresentam características distintas, relacionadas com a estrutura física e características inerentes aos utentes, nomeadamente grau de dependência, permitindo diferenciação da prestação de cuidados de saúde em cada instituição. Os lares de idosos 1, 2, 3 e 4, são típicos lares de idosos tradicionais, com características muito semelhantes a residências familiares, com poucos ou inexistência de utentes dependentes de cuidados de saúde, contrariamente aos utentes do lar de idosos 5 e 6, com utentes com diferentes níveis de dependência de cuidados de saúde, sendo a estrutura do lar de idosos semelhante a unidades de internamento, como as unidades de cuidados continuados e os serviços de internamento das unidades hospitalares. O lar de idosos 7 apresenta população mista de utentes independentes e utentes dependentes que partilham o mesmo espaço.

Recolheram-se duzentas e quarenta e oito amostras de fezes provenientes de residentes de lares de idosos, entre Janeiro de 2008 e Março de 2009, nomeadamente: 9

amostras no lar de idosos 1, em Janeiro de 2008; 21 amostras no lar de idosos 2, em Fevereiro, 2008; 37 amostras no lar de idosos 3, em Março, 2008; 25 amostras no lar de idosos 4, em Abril, 2009; 51 amostras no lar de idosos 5, em Maio-Junho, 2008; 41 amostras no lar de idosos 6, em Junho-Julho, 2008 e 64 amostras no lar de idosos 7, em Março, 2009.

1.1.2 – Unidades de Cuidados Continuados Integrados (UCCI)

A RNCCI foi criada a 6 de Junho de 2006, pelo Decreto-Lei n.º 101/2006 (Ministério da Saúde, Decreto-Lei n.º 101/2006) fomentando um modelo organizacional em parceria com o Ministério da Saúde e o Ministério do Trabalho e da Solidariedade Social, com o objectivo de prestação de cuidados de saúde e de apoio social, no processo de continuidade dos cuidados de saúde a pessoas, de todas as idades, que apresentem dependência, com diminuição ou perda de autonomia, tendo em conta o diagnóstico, ou mesmo prognóstico, cujas condições clínicas e sócio-familiares não lhes permitem permanência no domicílio (Decreto-Lei n.º 101/2006). Os doentes internados nas UCCI são referenciados para outras instituições de saúde ou de solidariedade e segurança social da Rede Nacional de Cuidados Continuados Integrados (RNCCI), unidades hospitalares ou do domicílio.

As três UCCI do distrito de Braga pertencem à RNCCI e apresentam diferentes tipologias de cuidados de saúde, nomeadamente: UCCI 1, da Santa Casa da Misericórdia, apresenta unidade de longa duração e manutenção (ULDM) com internamento até 90 dias; UCCI 2, da Santa Casa da Misericórdia local apresenta unidade de média duração e reabilitação (UMDR), com tempo de internamento entre 30 e 90 dias, tendo em atenção a evolução funcional do doente; UCCI 3 da Ordem Franciscana apresentam três tipologias de cuidados de saúde, unidade de longa duração e manutenção (ULDM), unidade de média duração e reabilitação (UMDR) e a tipologia de cuidados paliativos (CP) que se caracteriza pela inexistência de um período de internamento fixo. A UCCI 2 foi considerada da RNCCI, no entanto na fase inicial do estudo de colonização fecal, inerente à recolha de amostras de fezes, esta unidade era de cariz privado, passando a fazer parte da RNCCI um ano mais tarde. A recolha de amostras de fezes na UCCI 3 foi realizada aos primeiros doentes admitidos na unidade após abertura da mesma em Janeiro de 2012. A proximidade das UCCI com o Hospital de Braga foi critério de seleção das três UCCI, que constituem unidades de referenciação dos doentes após alta hospitalar, que necessitam de serem acompanhados em unidades de prestação de cuidados de saúde existentes na comunidade antes do regresso ao

domicílio. Inversamente, a unidade hospitalar, é aquela que recebe doentes das UCCI em casos de agudização para internamento hospitalar, ou em situações inerentes ao diagnóstico e/ou tratamento médico especializado inexistente nas UCCI (Figura 1).

Foram recolhidas setenta e quatro amostras de fezes de doentes internados nas três UCCI, no período compreendido entre Março de 2009 e Fevereiro de 2012, nomeadamente: 19 amostras na UCCI 1 em Abril, 2009; 17 amostras na UCCI 2 em Maio, 2009 e 38 amostras na UCCI 3 (Janeiro-Fevereiro, 2012).

1.2 – Processamento das amostras de fezes

As amostras de fezes (cerca de uma “noz”), preferencialmente com fragmentos de amostra contendo pús, muco ou sangue foram recolhidas para frascos estéreis (Murray *et al*, 2003) e o transporte realizado no prazo de 24h após colheita, em mala térmica através de arrefecimento por termoacumuladores. Na impossibilidade de tal, foram armazenadas no frigorífico à temperatura de 4°C num máximo de 24h (Murray *et al*, 2003). As amostras de fezes foram inoculadas em 40mL de meio de cultura de enriquecimento *Brain Heart Infusion* (BHI) (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) e incubadas durante 24h a 37°C. A partir da porção do sobrenadante e do sedimento do meio de BHI inoculou-se 200µl pela técnica de espalhamento em meio de cultura MacConkey agar, meio de cultura seletivo e diferencial para diferenciação de bacilos de Gram negativo fermentadores e não fermentadores da lactose, sem e com antibiótico β-lactâmico: cefotaxima (2mg/l), ceftazidima (2mg/l), aztreonamo (2mg/l) e imipenemo ou meropenemo (1µg/ml).

A avaliação da densidade e contagem de unidades formadoras de colónia por mililitro (UFC/mL) em cada meio de cultura efetuou-se após a 37°C a 24 a 48h, que permitiu avaliação semi-quantitativa a partir do enriquecimento. A contagem de colónias de bacilos de Gram negativo efetuada em meio de cultura selectivo com antibiótico a partir do enriquecimento em meio de cultura de BHI permitiu conhecer a densidade e efetuar a avaliação semi-quantitativa de bacilos de Gram negativo colonizadores do trato intestinal, resistentes à concentração dos oximiino-β-lactâmicos e carbapenemo presente no meio de cultura. A seleção de isolados de bacilos de Gram negativo, de morfotipos diferentes, orientada para fermentadores da lactose não descurando resultados do crescimento de bacilos de Gram negativo relevantes, foi efetuada de meio de cultura de seleção e reisolados no respetivo meio de seleção, com o objetivo de confirmar o crescimento e obtenção de culturas puras para teste de suscetibilidade aos antibióticos β-lactâmicos e não β-lactâmicos.

A avaliação da capacidade seletiva dos meios de cultura de MacConkey agar e MacConkey com antibiótico de seleção: ceftazidima (2µg/mL), cefotaxima (2µg/mL), aztreonamo (2µg/mL) e imipenemo ou meropenemo (1µg/mL) foi efetuada através da utilização da estirpe controlo, *Escherichia coli* ATCC® 25922 (ATCC, Virginia, U.S.A.), sensível aos antibióticos incorporados nos meios de cultura. A inibição do crescimento da estirpe controlo permitiu garantir a capacidade de seleção dos meios de cultura com antibiótico β -lactâmico, após confirmação da sua viabilidade em meio de cultura sem antibiótico β -lactâmico.

2 – Identificação dos isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs e/ou apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos

A identificação dos isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs e/ou apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos foi realizada com recurso às características morfológicas das colónias, métodos de identificação bioquímica convencionais e sistema de identificação bacteriana em miniatura para identificação de espécies da família *Enterobacteriaceae*, galeria API®20E (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, França) e/ou galeria de identificação ID32 GN para identificação de bacilos de Gram negativo (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, França).

2.1 – Determinação do fenótipo de resistência aos antibióticos em isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae*

2.1.1 - Teste de suscetibilidade aos antibióticos pelo método de difusão em agar

A caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos em isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* foi realizada pelo teste de suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos, pelo método de difusão em agar, de acordo com directrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), e a avaliação do perfil de suscetibilidade interpretada de acordo com o CLSI (CLSI, 2013) e o European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (EUCAST, 2013), para interpretação do halo de inibição da tigeciclina.

Para realização do teste de suscetibilidade aos antibióticos pelo método de difusão em agar foi preparada uma suspensão bacteriana com turvação de 0,5 na escala de McFarland. Para tal, ressuspenderam-se duas a cinco colónias provenientes de cultura pura, em cerca de 5ml de soro fisiológico estéril. A suspensão bacteriana preparada foi inoculada no meio de cultura Müller-Hinton II (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, França), por estrias apertadas, em três direções, perpendiculares entre si, por toda a superfície do meio de cultura. Os antibióticos testados, representativos do grupo dos antibióticos β -lactâmicos e dos antibióticos não β -lactâmicos, foram aplicados após 10 minutos da inoculação do meio de cultura (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, França). Os antibióticos³ β -lactâmicos e não β -lactâmicos avaliados e concentrações foram as seguintes:

- **antibióticos β -lactâmicos:** ampicilina (AML) (10 μ g); amoxicilina e ácido clavulânico (AMX) (30 μ g); ceftazidima (CAZ) (30 μ g); cefotaxima (CTX) (30 μ g); cefepime (FEP) (30 μ g); aztreonamo (ATM) (30 μ g); cefoxitina (FOX) (30 μ g), imipenemo (IPM) (10 μ g), ertapenemo (ETP) (10 μ g), meropenemo (MEM) (10 μ g) (Oxoid, Hampshire, Reino Unido).

- **antibióticos não β -lactâmicos:** estreptomicina (S) (10 μ g); gentamicina (CN) (10 μ g); netilmicina (NET) (30 μ g); tobramicina (TOB) (10 μ g); amicacina (AK) (30 μ g); tetraciclina (TE) (30 μ g); tigeciclina (TGC) (15 μ g); ácido nalidíxico (NA) (30 μ g); ciprofloxacina (CIP) (5 μ g); nitrofurantoína (F) (300 μ g); cloranfenicol (C) (30 μ g); trimetoprim-sulfametoxazol (T/S) (23,75 μ g) (Oxoid, Hampshire, Reino Unido).

Os diâmetros dos halos de inibição de crescimento bacteriano foram determinados para cada um dos antibióticos e analisada a presença de sinergismo e/ou antagonismo, após 18h a 24h de incubação, a 37°C. Os resultados do teste de suscetibilidade aos antibióticos foram classificados nas categorias sensível (S), intermédia (I) ou resistente (R), de acordo com os critérios interpretativos propostos pelo CLSI e EUCAST, e após verificação da suscetibilidade, a todos os antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos, da estirpe controlo *Escherichia coli* ATCC® 25922 (CLSI, 2013; EUCAST, 2013).

³ As siglas dos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos utilizadas no método de difusão em agar e nas cartas de suscetibilidade dos sistemas automatizados Vitek 2 system e WalkAway foram uniformizadas de forma a utilizar a mesma sigla

2.1.2 - Avaliação da expressão de β -lactamases de Espectro Alargado

i) Detecção de sinergismo no teste de suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos pelo método de difusão em agar

A detecção da expressão de ESBLs foi avaliada pela presença de sinergismo entre os discos de oximino- β -lactâmicos e o disco da associação amoxicilina com ácido clavulânico, no teste de suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos pelo método de difusão em agar.

ii) Teste de adição de ácido clavulânico

A detecção e/ou confirmação da presença de ESBLs foi realizada pela adição de 10ug de ácido clavulânico ao disco de oximino- β -lactâmico com maior redução da suscetibilidade apresentado no método de difusão em agar. Um aumento igual ou superior a 5mm entre o disco de oximino- β -lactâmico com ácido clavulânico, comparativamente ao disco de oximino- β -lactâmico sem ácido clavulânico é sugestivo da presença de produção de ESBL.

3 – Isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBLs e isolados apresentando redução da susceptibilidade aos carbapenemos responsáveis por infeções do Hospital de Braga

A seleção de isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs responsáveis por infeções foi realizada em duas fases, de acordo com o período temporal de recolha de amostras de fezes dos doentes das UCCI, de Fevereiro a Maio de 2009 e de Janeiro a Março de 2012. Os isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* com redução da suscetibilidade aos carbapenemos foram recolhidos entre Fevereiro de 2009 a Dezembro de 2012, provenientes dos diferentes serviços do hospital de Braga.

O estudo dos isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs ou apresentando redução de suscetibilidade aos carbapenemos responsáveis por infeções foi acompanhada de consulta dos processos clínicos dos doentes para averiguação das seguintes informações: idade, sexo, informação clínica, produto biológico, serviço, proveniência do doente antes da admissão hospitalar e presença de

dispositivos médicos invasivos de tratamento e/ou diagnóstico, através da aplicação informática Glintt de gestão de processos clínicos dos doentes para profissionais de saúde do hospital de Braga.

3.1 – Hospital de Braga

O Hospital de Braga é a unidade hospitalar de referência da região norte de Portugal, integrado no Serviço Nacional de saúde, no âmbito de uma Parceria Público Privada celebrada através de um contrato de gestão assinado pela Administração Regional de Saúde Norte, em representação do Ministério da Saúde. A unidade hospitalar destina-se à prestação de cuidados médicos agudos a cerca de 1,2 milhões de pessoas dos distritos de Braga e Viana do Castelo, com capacidade de internamento até 705 camas (Hospital de Braga, 2013).

O hospital de Braga contempla trinta e oito serviços de especialidade, nomeadamente anatomia patológica, anestesiologia, angiologia e cirurgia vascular, cardiologia, cardiologia pediátrica, cirurgia geral, cirurgia maxilofacial, cirurgia pediátrica, cirurgia plástica reconstrutiva e estética, dermatovenerologia, doenças infecciosas, endocrinologia, estomatologia/medicina dentária, gastroenterologia, genética médica, ginecologia/obstetrícia, imuno-alergologia, imuno-hemoterapia, medicina física e de reabilitação, medicina interna, medicina nuclear, nefrologia, neurocirurgia, neurologia, neurorradiologia, oftalmologia, oncologia médica, ortopedia, otorrinolaringologia, patologia clínica, pediatria, pneumologia, psiquiatria, psiquiatria da infância e da adolescência, radiodiagnóstico, radioterapia, reumatologia e urologia; oito unidades especiais, designadamente cuidados intensivos polivalentes, cuidados neurocríticos, cuidados intermédios coronários, cuidados intermédios médicos, cuidados especiais neonatais, cuidados intermédios pediátricos, hospital de dia oncológico, hospital de dia médico; serviço de urgência e consultas externas de diversas especialidades (Hospital de Braga, 2013).

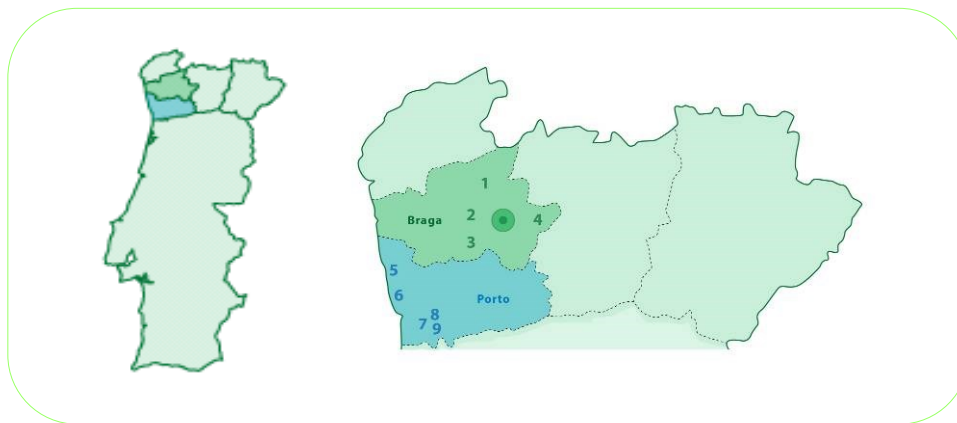


Figura 12 - Localização do Hospital de Braga (HB) e instituições de prestação de cuidados de saúde na comunidade, lares de idosos (LI) e UCCI (UC), do distrito de Braga e Porto.

Legenda: Distrito de Braga: ● HB -Hospital de Braga; 1 - UC- 2, UCCI 2; 2 -UC -3, UCCI 3; 3 - LI - 3, Lar de idosos 3; 4 - UC-1, UCCI 4 e LI- 7, Lar de idosos 7; Distrito do Porto: 7 - LI 1, Lar de idosos 1; 8 - LI 2, Lar de Idosos 2; 9 - LI 4, Lar de idosos 4; 5 - LI 5, Lar de idosos 5; 6 - LI 6, Lar de idosos 6.

3.2 – Métodos automatizados de identificação e de determinação da suscetibilidade aos antibióticos

A identificação e teste de suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos dos isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* do Hospital de Braga, foram efetuados com recurso aos sistemas automatizados do laboratório de Microbiologia do serviço de Patologia Clínica, sistema automatizado Vitek 2 System (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) e/ou MicroScan WalkAway (Dade Behring, CA, EUA), utilizando cartas específicas de identificação e de suscetibilidade a diferentes classes de antibióticos. As cartas de suscetibilidade aos antibióticos consistem em miniaturizações desidratadas de teste suscetibilidade por diluição em caldo de cultura de Mueller-Hinton. Foram reconstituídas com suspensões bacterianas, preparadas a partir de culturas puras, com turvação equivalente a 0,5 McFarland em solução salina. As cartas de suscetibilidade aos antibióticos utilizados nos dois sistemas automatizados permitem a avaliação de um conjunto de antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos indicados a seguir:

i) Sistema automatizado Vitek 2 System

- **Carta AST-N192:** ampicilina (AM); amoxicilina com ácido clavulânico (AMC); piperacilina/tazobactam (TZP); cefalotina (CF); cefuroxima (CXM); cefotaxima (CTX); ceftazidima (CAZ); ertapenemo (ETP); meropenemo (MEM); gentamicina (CN); tobramicina (TOB); amicacina (AK); ciprofloxacina (CIP); levofloxacina (LVX); nitrofurantoína (F); trimetoprim/sulfametoxazol (T/S), e pesquisa de ESBLs pela presença de cefotaxima e ceftazidima com e sem ácido clavulânico.

- **Carta AST-N222:** piperacilina (PIP); piperacilina/tazobactam (TZP); rifampicina (RA); ticarcilina (TI); ticarcilina com ácido clavulânico (TIC); ceftazidima (CAZ); cefepime (FEP); aztreonamo (ATM); imipenemo (IPM); meropenemo (MEM); tobramicina (TOB); amicacina (AK); ciprofloxacina (CIP); trimetoprim/sulfametoxazol (T/S); colistina (CS); gentamicina (CN); minociclina (MNO); pefloxacina (PEF).

– Sistema automatizado WalkAway

- **painel MicroScan ESBL plus:** ampicilina (AM), amoxicilina com ácido clavulânico (AUG), ceftazidima (CAZ), ceftazidima com ácido clavulânico (CAZ/CA), cefalotina (CF), cefotaxima (CFT), cefotaxima com ácido clavulânico (CFT/CA), cefoxitina (CFX), cefazolina (CFZ), ciprofloxacina (CIP), cefepime (CPE), cefuroxima (CRM), ertapenemo (ETP), nitrofurantoína (F), fosfomicina (FOS), gentamicina (CN), imipenemo (IMP), ácido nalidíxico (NA), norfloxacina (NOR ou NXN), piperacilina/tazobactam (P/T), trimetoprim/sulfametoxazol (T/S), tobramicina (TOB).

A interpretação da CMI para cada um dos antibióticos foi efetuada após verificação da CMI para a estirpe controlo, *Escherichia coli* ATCC25922 e/ou *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603, por interpretação da concentração antimicrobiana mais baixa, que promova inibição de crescimento bacteriano, e avaliadas através do software de interpretação e validação de cada equipamento, por um conjunto de parâmetros definidos pelas respectivas casas comerciais.

3.3 – Determinação da Concentração Mínima Inibitória por E-test para isolados produtores de β -lactamases de Espectro Alargado e de Metallo- β -Lactamases

A CMI ($\mu\text{g/ml}$) foi determinada por E-test (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), para detecção e/ou confirmação da produção de ESBLs e MBLs, nos isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* do hospital de Braga. O meio de cultura e método de inoculação utilizado nesta técnica é o mesmo utilizado no teste de suscetibilidade aos antibióticos pelo método de difusão em agar, descrito anteriormente. Na superfície do meio de cultura inoculado colocaram-se tiras de E-test impregnadas com antibiótico apresentando um gradiente de concentração. Após incubação dos meios de cultura, a 35-37°C durante 18-24 horas, observou-se uma zona de inibição de crescimento de bacteriano, de forma elíptica.

Para detecção de ESBLs, a determinação da CMI foi efetuada através da utilização de tira E-test com antibiótico cefotaxima e cefotaxima com ácido clavulânico (CT/CTL), ceftazidima e ceftazidima com ácido clavulânico (TZ/TZL), e cefepime e cefepime com ácido clavulânico (PM/PML). A detecção fenotípica de MBLs foi realizada com tira E-test com imipenemo e imipenemo com EDTA (IP/IPI). A CMI foi lida na interceção do vértice da elipse com a tira E-test e/ou se observou presença de zona “fastama” no caso das ESBLs.

4 – Caracterização de genes de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos

A caracterização molecular de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos foi realizada por PCR em isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* do estudo de colonização fecal e responsáveis por infeções do hospital de Braga. Nas reacções de amplificação por PCR foram utilizados primers e condições específicas.

4.1 – Condições gerais das reacções de amplificação de DNA por PCR

4.1.1 – Extração de DNA bacteriano

A extração de DNA total bacteriano foi realizado pelo método convencional, *boiling-centrifugation*, que consiste na lise de suspensão bacteriana por fervura. Os isolados submetidos a reacção de amplificação por *Polimerase Chain Reaction* (PCR) foram

previamente isolados em meio de cultura *CLED* (Cistina-Lactose electrólito deficiente) e/ou meio de cultura Gelose de Sangue, após incubação a 37°C durante um período de 18 a 24h. Posteriormente, 3 a 5 colónias provenientes de culturas puras e recentes, foram ressuspensas em 300µl de água destilada estéril. A extração de DNA consistiu na lise da suspensão bacteriana, por fervura a 100°C durante 10 minutos, seguida da remoção dos resíduos celulares por centrifugação, durante 5 minutos a 10000 rpm. Os sobrenadantes obtidos, contendo o DNA, foram conservados a -20°C para utilização posterior nas várias reacções de PCR.

4.1.2 – Condições de amplificação das reacções de PCR

As reacções de amplificação por PCR foram preparadas com um volume final de 25µl, com os seguintes componentes: água ultra pura estéril, tampão da reacção, cloreto de magnésio (MgCl₂), primers (forward e reverse), desoxirribunucleotídeos (dNTP's) e Taq polimerase (Finnzymes DyNAzyme II DNA Polymerase e a enzima FastStart Taq DNA Polymerase (Roche) para detecção de genes codificadores de carbapenemases). As concentrações dos componentes e condições das reacções de amplificação foram ajustadas de acordo com o descrito na bibliografia para os primers utilizados, reagentes e tamanho do fragmento a amplificar. As reacções de PCR foram realizadas no termociclador, Thermocycler Biometra e no termociclador *iCycler* (BioRad).

Na avaliação dos resultados das reacções de amplificação foram utilizados controlos de reacção negativo, água ultra pura estéril e controlos de reacção positivo. As estirpes controlo da Health Protection Agency (HPA) utilizadas nas reacções de amplificação foram as seguintes: *Escherichia coli* NCTC13451 com 10 genes de resistência aos antibióticos, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *aac(6')-Ib-cr*, *mph(A)*, *catB4*, *tet(A)*, *aadA5*, *sul 1* e *dfrA7*; *Klebsiella pneumoniae* NCTC13438 produtora de KPC-3 e *Klebsiella pneumoniae* NCTC13440 produtora VIM-1. Na reacção de amplificação do gene *bla*_{OXA-48} utilizou-se a estirpe *Klebsiella pneumoniae* produtora de OXA-48, cedida por Laurent Poirel.

4.1.3 – Caracterização dos genes que codificam β-lactamases

A caracterização dos genes produtores de β-lactamases em isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* foi realizada através do método de amplificação por PCR, após detecção da produção de ESBL no teste de suscetibilidade aos antibióticos β-lactâmicos e/ou adição de ácido clavulânico ao disco de oximino-β-

lactâmico com maior redução de suscetibilidade. O estudo foi dirigido para a detecção molecular das famílias da classe A das ESBLs mais frequentes e da classe D, utilizando primers e condições de amplificação específicas, para detecção dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{OXA} (Tabela 1). A pesquisa dos genes foi efetuada através de duas reações de PCR distintas, PCR multiplex utilizando primers específicos para detecção dos genes *bla*_{TEM} (variantes TEM-1 e TEM-2), *bla*_{SHV} (inclui variantes SHV incluindo SHV-1) e *bla*_{OXA} (detecção do gene OXA-1-like, que inclui OXA-1, OXA-4 e OXA-30), e detecção dos genes *bla*_{CTX-M} do grupo 1 (inclui CTX-M-1, CTX-M-3 e CTX-M-15) por PCR simplex (Dallenne *et al*, 2010).

4.1.4 – Caracterização dos genes que codificam carbapenemases

A caracterização de genes que codificam carbapenemases foi realizada por amplificação dos genes *bla* por PCR, com recurso a primers e condições específicas de amplificação. Foram caracterizados os genes *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{IMP-22}, *bla*_{VIM} e *bla*_{OXA-48} em isolados de *Klebsiella pneumoniae* e de *Escherichia coli*, após detecção de redução da suscetibilidade aos carbapenemos no teste de suscetibilidade aos antibióticos β-lactâmicos pelo método de difusão em agar (Tabela 1).

A pesquisa dos genes foi efetuada através de reações de PCR simplex para detecção de cada um dos genes *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP-22} e *bla*_{OXA-48} e reação de PCR multiplex para detecção dos genes *bla*_{IMP} (inclui as variantes IMP-9, -16, -18, -22 e -25), *bla*_{KPC} (KPC-1 a KPC-5) e *bla*_{VIM} (inclui as variantes VIM-1 e -2) (Dallenne *et al*, 2010).

4.1.5 – Caracterização de genes que codificam resistência aos antibióticos não β-lactâmicos

A caracterização de genes de resistência aos antibióticos não β-lactâmicos foi realizada por PCR, com recurso a primers e condições específicas de amplificação para detecção dos genes *aac6'-lb-cr*, *qnrA*, *aac(3)-IV*, *gyrA*, *sul1* e *tetA* (Tabela 2).

Tabela 2 - Sequência nucleotídica dos *primers* utilizados nas reacções de PCR e de sequenciação

Objetivo	Gene	Nome do primer	Seqência do Primer (5'→3')	Tamanho do produto amplificado (pb)	Referência
β-lactamases	bla _{TEM}	TEM F TEM R	(1) 5'-CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC-3' 5'-CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC-3'	800	Dallenne <i>et al</i> , 2010
		TEM F (sequenciação) TEM R (sequenciação)	5'-ATGAGTATTCAACATTTCCG-3' 5'-CTGACAGTTACCAATGCTTA-3'	867	Coque <i>et al</i> , 2008b
	bla _{SHV}	SHV F SHV R	(2) 5'-AGCCGCTTGAGCAAATTAAC-3' 5'- ATCCCGCAGATAAATCACCAC-3'	713	Dallenne <i>et al</i> , 2010
	bla _{OxA}	OXA F OXA R	(3) 5'-GGCACCAGATTCAACTTTCAAG-3' 5'-GACCCCAAGTTTCTGTAAGTG-3'	564	Dallenne <i>et al</i> , 2010
		OXAIII F (sequenciação) OXAIII R (sequenciação)	5'-TTTTCTGTTGTTGGGTTTT-3' 5'-TTTCTTGCTTTTATGCTTG-3'	450	Coque <i>et al</i> , 2008b
	bla _{CTX-M do grupo 1}	CTX-M grupo 1 F CTX-M grupo 1 R	(4) 5'-TTAGGAARTGTGCCGCTGYA -3' 5'-CGATATCGTTGGTGGTRCCAT -3'	688	Dallenne <i>et al</i> , 2010
		CTX-Mgroup 1 F (sequenciação) CTX-Mgroup 1 R (sequenciação)	5'-CCCATGGTTAAAAATCACTGC-3' 5'-CAGCGCTTTTGCCGCTCTAAG-3'	830	Carattoli <i>et al</i> , 2008
		M13U (sequenciação) M13L	5'-GGTTAAAAAATCACTGCGTC-3' 5'-TTGGTGACGATTTTAGCCGC-3'	863	Leflon-Guibout <i>et al</i> , 2004
		bla _{CTX-M-15} (Região 3' do gene)	CTX-M-F1 (sequenciação)	5'-ATAAACCCGGCAGCGGTG-3'	483
MBLs	bla _{IMP}	IMP F IMP R	(5) 5'-TTGACACTCCATTACDG- 3' 5'-GATYGAGAATTAAGCCACYCT- 3'	139	Dallenne <i>et al</i> , 2010
	bla _{VIM}	VIM F VIM R	(6) 5'-GATGGTGTGTTGGTCGCATA- 3' 5'-CGAATGCGCAGCACCAG- 3'	390	Dallenne <i>et al</i> , 2010
	bla _{IMP-22}	IMP-22 F IMP-22 R	5'-ATGAAGAAATTATTTGTTTATGTGT- 3' 5'-TTAGTTACTTGGCTCTGATGG- 3'	741	Pellegrini <i>et al</i> , 2009
	bla _{OXA-48}	OXA-48 F OXA-48 R	5'-GCTTGATCGCCCTCGATT- 3' 5'-GATTTGCTCCGTGGCCGAAA- 3'	281	Dallenne <i>et al</i> , 2010
	bla _{NDM}	NDM-F NDM-R	5'-GGTTTGGCGATCTGGTTTTG-3' 5'-CGGAATGGCTCATCACGATC-3'	621	Poirel <i>et al</i> , 2011b

Legenda: A - adenina, T - timina, C - citosina, G - guanina; F ou 1 - forward, R ou 2 - reverse; Y=T ou C; R=A ou G; S=G ou C; D=A ou G or T; (1) - inclui as variantes TEM-1 e TEM-2; (2) - inclui a variante SHV-1; (3) - inclui as variantes OXA-1, OXA-4 e OXA-30; (4) - inclui as variantes CTX-M-1, CTX-M-3 e CTX-M-15; (5) - inclui as variantes IMP-9, -16, -18, -22 e -25; (6) - inclui as variantes VIM-1 e VIM-2; (7) - inclui as variantes KPC-1 a KPC-5

Tabela 2 (Continuação) - Sequência nucleotídica dos *primers* utilizados nas reacções de PCR e de sequenciação

Objectivo	Gene	Nome do primer	Seqência do Primer (5'→3')	Tamanho do produto amplificado (pb)	Referência
Carbapanemases classe A	<i>bla_{KPC}</i>	KPC F (7) KPC R	5'- CATTCAAGGGCTTTCTTGCTGC- 3' 5'- ACGACGGCATAGTCATTTCG- 3'	538	Dallenne <i>et al</i> , 2010
	<i>bla_{KPC}</i>	KPC F (sequenciação) KPC R (sequenciação)	5'- TGTCAGTGTATCGCCGTCTAG-3' 5'- TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC-3'	880	Gootz <i>et al</i> , 2009
Resistência tetraciclina	às	<i>tetA</i> tetA 1 tetA 2	5'- GTAATTCTGAGCACTGTCGC-3' 5'- CTGCCTGGACAACATTGCTT-3'	950	Sandvang <i>et al</i> , 1997
		<i>tetB</i> tetB 1 tetB 2	5'- CTCAGTATTCCAAGCCTTTG-3' 5'- ACTCCCCTGAGCTTGAGGGG-3'	430	Sengelov <i>et al</i> , 2003
Resistência aminoglicosídeos quinolonas	aos e	<i>aac(6')-Ib-cr</i> aac-cr- F aac-cr-R	5'-TTG CGA TGC TCT ATG AGT GG-3' 5'-GCG TGT TCG CTC GAA TGC C-3'	400	Coque <i>et al</i> , 2008b
Resistência gentamicina	à	<i>aac(3)-IV</i> aac(3)-IV- F aac(3)-IV- R	5'- GTGTGCTGCTGGTCCACAGC-3' 5'- AGTTGACCCAGGGCTGTCGC-3'	705	Rosengren <i>et al</i> , 2009
Resistência quinolonas	às	<i>Coli gyrA</i> ColigyrA F ColigyrA R	5'-ACGTACTAGGCAATGACTGG-3' 5'-AGAAGTCGCCGTCGATAGAAC-3'	189	Sorlozano <i>et al</i> , 2007
		<i>qnrA</i> qnrA F qnrA R	5'- AGAGGATTTCTACGCCAGC-3' 5'- TGCCAGGCACAGATCTTG-3'	580	Cattoir <i>et al</i> , 2007
Resistência sulfonamidas	às	<i>sul1</i> sul1 F sul1 R	5'- TGAGATCAGACGTATTGCGC-3' 5'- TTGAAGGTTTCGACAGCACGT-3'	400	Coque <i>et al</i> , 2008b
Identificação do grupo clonal O25b-ST131		O25pabBspe-F O25pabBspe-R	5'-TCCAGCAGGTGCTGGATCGT-3' 5'- GCGAAATTTTCGCCGTAAGTGT-3'	347	Clermont <i>et al</i> , 2009
Grupos filogenéticos A, B1, B2 e D	<i>chuA</i>	ChuA. 1 ChuA. 2	5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3' 5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'	279	Clermont <i>et al</i> , 2000
	<i>yjaA</i>	YjaA. 1 YjaA. 2	5'-TGAAGTGTCAGGAGACGCTG-3' 5'-ATGGAGAATGCGTTCTCTCAAC-3'	211	
	<i>tspE4C2</i>	TspE4C2. 1 TspE4C2. 2	5'-GAGTAATGTCTGGGGCATTCA-3' 5'-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3'	152	

Legenda: A - adenina, T - timina, C - citosina, G - guanina; F ou 1 - forward, R ou 2 - reverse; Y=T ou C; R=A ou G; S=G ou C; D=A ou G ou T; (1) - inclui as variantes TEM-1 e TEM-2; (2) - inclui a variante SHV-1; (3) - inclui as variantes OXA-1, OXA-4 e OXA-30; (4) - inclui as variantes CTX-M-1, CTX-M-3 e CTX-M-15; (5) - inclui as variantes IMP-9, -16, -18, -22 e -25; (6) - inclui as variantes VIM-1 e VIM-2; (7) - inclui as variantes KPC-1 a KPC-5

5 – Caracterização molecular de isolados de *Escherichia coli* produtores de β -lactamases de Espectro Alargado

5.1 – Identificação do grupo clonal O25b-ST131 por PCR

A detecção do grupo clonal O25b-ST131 nos isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs foi realizada por PCR segundo o descrito por Clermont e colaboradores (Clermont *et al*, 2009). A detecção consistiu na amplificação do alelo específico *pabB* presente em isolados de *Escherichia coli* do referido grupo clonal (Tabela 3). A interpretação dos resultados foi realizada atendendo à presença do gene *trpA* como controlo positivo da amplificação e à presença e/ou ausência do gene *pabB*. Isolados de *Escherichia coli* com amplificação apenas do gene *trpA* foram considerados não pertencentes ao grupo clonal O25b-ST131 e isolados de *Escherichia coli* que amplificaram o gene *trpA* e o gene *pabB* foram considerados pertencentes ao grupo clonal O25b-ST131 (Clermont *et al*, 2009).

5.2 – Identificação do grupo filogenético dos isolados de *Escherichia coli* produtora de β -lactamases de Espectro Alargado

Os grupos filogenéticos A, B1, B2 e D foram identificados por PCR nos isolados de *Escherichia coli*. A técnica de PCR descrita por Clermont e colaboradores (Clermont *et al*, 2000) permite a classificação rápida dos grupos filogenéticos em isolados de *Escherichia coli* através da combinação de três genes: gene *chuA* (codificador de um receptor da membrana externa); gene *yjaA* (função desconhecida) e um fragmento de DNA *tspE4.C2* (Tabela 2). A avaliação do grupo filogenético foi realizada pela interpretação da presença ou ausência dos genes *chuA*, *yjaA* e o fragmento de DNA *tspE4.C2*, de acordo com o proposto por Clermont e colaboradores (Clermont *et al*, 2000). A classificação dos grupos filogenéticos nos isolados de *Escherichia coli* baseou-se no seguinte: grupo filogenético A: ausência do gene *chuA* e fragmento *tspE4.C2*; grupo filogenético B1: ausência do gene *chuA* e presença do fragmento *tspE4.C2*; grupo filogenético B2: presença dos genes *chuA* e *yjaA*; grupo filogenético D: presença do gene *chuA* e ausência do gene *yjaA* (Clermont *et al*, 2000).

Nas reacções de amplificação por PCR para detecção dos grupos filogenéticos foram utilizados isolados de *Escherichia coli* dos grupos filogenéticos A, B1, B2 e D com objectivo de controlo cedidos pela Professora Doutora Luísa Peixe.

5.3 – Caracterização de genes que codificam fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* produtores de β -lactamases de Espectro Alargado

Com o objectivo de avaliar o potencial virulento procedeu-se a uma abordagem exploratória de fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs colonizadores do trato intestinal de residentes de lares de idosos e de UCCI e isolados responsáveis por infeções provenientes do hospital de Braga. A pesquisa de genes codificadores de vinte e nove fatores de virulência foi efetuada por PCR em isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs, com recurso a primers e condições específicas de amplificação (Tabela 3). Os resultados foram validados pela ausência de amplificação no controlo negativo, composto por água ultra pura estéril, e por comparação dos fragmentos amplificados com o marcador de peso molecular utilizado.

Tabela 3 - Sequência nucleotídica dos primers utilizados nas reacções de amplificação para detecção de genes codificadores de fatores de virulência

Gene		Designação do primer	Sequência do Primer (5'→3')	Tamanho do produto amplificado (pb)	Referência
Iha de Patogenicidade	PAI	RPAi F	5'- GGACATCCTGTTACAGCGCGCA-3'	930	Johnson <i>and</i> Stell, 2000
		RPAi R	5'- TCGCCACCAATCACAGCCGAAC-3'		
Adesinas	<i>papAH</i>	PapA F	5'- ATGGCAGTGGTGCTTTTGGTG- 3'	720	
		PapA R	5'- CGTCCCACCATACGTGCTCTTC -3'		
	<i>papC</i>	PapC F	5'- GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA -3'	200	
		PapC R	5'- ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA-3'		
	<i>papEF</i>	PapEF F	5'-GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT-3'	326	
		PapEF R	5'-AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA-3'		
	<i>papG</i>	pG F	5'- CTGTAATTACGGAAGTGATTCTG-3'	1070	
		<i>II, III</i> pG R	5'- ACTATCCGGCTCCGGATAAACCAT-3'		
	<i>I</i>	pG1''r	5'- TCCAGAAATAGCTCATGTAACCCG-3'	1190	
	<i>papG allele 1</i>	AlleleI F	5'- TCGTGCTCAGGTCCGGAATTT-3'	461	
		AlleleI R	5'- TGGCATCCCCAACATTATCG-3'		
	<i>paG allele 1'</i>	Allele1'\ -f	5'- CTACTATAGTTCATGCTCAGGTC-3'	474	
		Allele1'\ -r	5'- CTGACATCCTCCAACATTATCGA-3'		
	<i>papG allele II</i>	AlleleII - f	5'- GGGATGAGCGGGCCTTTGAT-3'	190	
		AlleleII-r	5'- CGGGCCCCCAAGTAACTCG-3'		
	<i>papG allele III</i>	AlleleIII-f	5'- GGCCTGCAATGGATTTACCTGG-3'	258	
		AlleleIII-r	5'- CCACCAAATGACCATGCCAGAC-3'		
	<i>sfalfocDE</i>	Sfa 1	5'-CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC-3'	410	
Sfa 2		5'- CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA-3'			

Legenda: Y=T ou C; R=A ou G; S= G ou C; D=A ou G ou T; F - forward, R - reverse; * - utilizar com o primer KpsII reverse; ** - utilizar com o primer KpsIII reverse

Tabela 3 (continuação) - Sequência nucleotídica dos primers utilizados nas reacções de amplificação para detecção de genes codificadores de fatores de virulência

Gene	Designação do primer	Sequência do Primer (5'→3')	Tamanho do produto amplificado (pb)	Referência
	<i>SfaS</i>	SfaS F SfaS R	5'- GTGGATACGACGATTACTGTG-3' 5'- CCGCCAGCATTCCCTGTATTC-3'	240
	<i>focG</i>	FocG F FocG R	5'- CAGCACAGGCAGTGGATACGA- 3' 5'- GAATGTCGCCTGCCCATGCT-3'	360
	<i>afaldrABC</i>	Afa F Afa R	5'- GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC-3' 5'- CCCGTAACGCGCCAGCATCTC-3'	559
	<i>bmaE</i>	bmaE F bmaE R	5'- ATGGCGCTAACTTGCCATGCTG-3' 5'- AGGGGGACATATAGCCCCCTTC-3'	507
	<i>gafD</i>	gafD F gafD R	5'- TGTTGGACCGTCTCAGGGCTC-3' 5'- CTCCCGGAACGCTGTTACT-3'	952
	<i>nfaE</i>	nfaE F nfaE R	5'- GCTTACTGATTCTGGGATGGA-3' 5'- CGGTGGCCGAGTCATATGCCA-3'	559
	<i>fimH</i>	fimH F fimH R	5'- TGCAGAACGGATAAGCCGTGG-3' 5'- GCAGTCACCTGCCCTCCGTA-3'	508
				Johnson and Stell, 2000
Toxinas	<i>hlyA</i>	hly f hly r	5'-ACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT-3' 5'-ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA-3'	1177
	<i>cnf-1</i>	cnf1 cnf2	5'-AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG-3' 5'-CATTGAGAGTCCTGCCCTCATTATT-3'	498
	<i>cdt B</i>	cdt-a 1	5'- AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA-3'	430
		cdt-a 2	5'- AAATCTCCTGCAATCATCCAGTTTA-3'	
		cdt-s 1	5'- GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG-3'	
		cdt-s 2	5'- GAAAATAAATGGAACACACATGTCCG-3'	

Legenda: Y=T ou C; R=A ou G; S= G ou C; D=A ou G ou T; F - forward, R - reverse; * - utilizar com o primer KpsII reverse; ** - utilizar com o primer KpsIII reverse

Tabela 3 (continuação) - Sequência nucleotídica dos primers utilizados nas reacções de amplificação para detecção de genes codificadores de fatores de virulência

Gene		Designação do primer	Sequência do Primer (5'→3')	Tamanho do produto amplificado (pb)	Referência
Sideróforos	<i>FyuA</i>	FyuA F FyuA R	5'- TGATTAACCCCGCGACGGGAA-3' 5'- CGCAGTAGGCACGATGTTGTA-3'	880	Spurbeck <i>et al</i> , 2012
	<i>iutA</i>	AerJ F AerJ R	5'- GGCTGGACATCATGGGAACTGG-3' 5'-CGTCGGGAACGGGTAGAATCG-3'	300	Johnson <i>and</i> Stell, 2000
	<i>chuA</i>	chuA-forward chuA-reverse	5'- CTGAAACCATGACCGTTACG-3' 5'- TTGTAGTAACGCACTAAACC-3'	652	Spurbeck <i>et al</i> , 2012
Cápsulas	<i>kpsMTII</i>	kpsII F kpsII R	5'- GCGCATTTGCTGATACTGTTG-3' 5'- CATCCAGACGATAAGCATGAGCA-3'	272	Johnson <i>and</i> Stell, 2000
	<i>kpsMTIII</i>	kpsIII F kpsIII R	5'- TCCTCTTGCTACTATTCCCCT-3' 5'- AGGCGTATCCATCCCTCCTAAC-3'	392	Johnson <i>and</i> Stell, 2000
	<i>kpsMT K1</i>	K1-F*	5'- TAGCAAACGTTCTATTGGTGC-3'	153	Johnson <i>and</i> Stell, 2000
	<i>KpsMT K5</i>	K5-F**	5'- CAGTATCAGCAATCGTTCTGTA-3'	159	Johnson <i>and</i> Stell, 2000
Diversos	<i>rfc</i>	rfc - f rfc - r	5'- ATCCATCAGGAGGGGACTGGA-3' 5'- AACCATACCAACCAATGCGAG-3'	788	Johnson <i>and</i> Stell, 2000
	<i>ibeA</i>	ibe10 F ibe10 R	5'- AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC-3' 5'- TGGTGCTCCGGCAAACCATGC-3'	170	Johnson <i>and</i> Stell, 2000
	<i>cvaC</i>	CoIV-Cf CoIV-Cr	5'- CACACACAAACGGGAGCTGTT-3' 5'- CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT-3'	680	Johnson <i>and</i> Stell, 2000
	<i>traT</i>	TraT F TraT R	5'- GGTGTGGTGCGATGAGCACAG-3' 5'- CACGGTTCAGCCATCCCTGAG-3'	290	Johnson <i>and</i> Stell, 2000
	<i>vat</i>	vat-forward vat-reverse	5'- TCAGGACACGTTTCAGGCATTCACT-3' 5'- GGCCAGAACATTTGCTCCCTTGTT-3'	1100	Spurbeck <i>et al</i> , 2012
	<i>yfcV</i>	yfcV-forward yfcV-reverse	5'- ACATGGAGACCACGTTCAACC-3' 5'- GTAATCTGGAATGTGGTCAGG-3'	292	Spurbeck <i>et al</i> , 2012

Legenda: Y=T ou C; R=A ou G; S= G ou C; D=A ou G ou T; F - forward, R - reverse; * - utilizar com o primer KpsII reverse; ** - utilizar com o primer KpsIII reverse

5.4 – Eletroforese em gel de agarose e visualização dos produtos de amplificação

Os produtos de amplificação das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBS (Tris-base 40mM, EDTA 1mM, ácido acético glacial, pH 8) a 120V durante cerca de 20 minutos. Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml), durante cerca de 20 minutos, e os fragmentos visualizados no transluminador de luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos obtidos foi estimado por comparação com o marcador de peso molecular de 50pb ou de 100pb (BioRad) e com o tamanho do fragmento do controlo positivo utilizado nas reações de PCR.

5.5 – Sequenciação

Os genes que codificam ESBLs e carbapenemases foram sequenciados no laboratório de Biologia Molecular do serviço de Patologia Clínica do Hospital de Braga e/ou na empresa STAB VIDA (Campus UNL, Caparica, Portugal). A sequenciação dos genes *bla*_{IMP} e *bla*_{KPC} foi realizada no sequenciador automático ABI 3700 (Applied Biosystems, Perkin-Elmer, Foster City, CA) do laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Braga, e a sequenciação dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA} e *bla*_{CTX-M grupo 1} na empresa STAB VIDA (Campus UNL, Caparica, Portugal).

5.5.1 – Sequenciação dos genes *bla*_{IMP} e *bla*_{KPC}

O produto de amplificação por PCR dos genes *bla*_{IMP} e *bla*_{KPC} num primeiro passo para sequenciação, foi extraído a partir de gel de agarose (1%). Na purificação do produto de PCR foi utilizado EDTA/acetato de sódio e etanol a 96%, após centrifugação, álcool a 70%, para purificação do produto de amplificação e remoção de resíduos do gel de agarose. As reacções de sequenciação, submetidas a PCR, foram preparadas utilizando o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Os produtos de sequenciação foram purificados com álcool a 70% e colocados no sequenciador automático ABI 3700 (Applied Biosystems, Perkin-Elmer, Foster City, CA).

5.5.2 – Sequenciação dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA} e *bla*_{CTX-M grupo 1}

Os produtos de amplificação dos genes *bla*_{CTX-M grupo 1}, *bla*_{TEM} e *bla*_{OXA} foram purificados em colunas de purificação de fragmentos de PCR segundo o protocolo de purificação e enviados para os serviços de sequenciação da empresa STAB VIDA (Campus UNL, Caparica, Portugal).

As sequências nucleotídicas obtidas foram analisadas através do programa Basic Local Alignment Search Tool” (Blast) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) permitindo a pesquisa de sequências semelhantes disponíveis na base de dados genéticos mundiais, como o GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

5.6 – Transferência de genes de resistência por conjugação bacteriana

A avaliação da capacidade de transferência de genes codificadores de ESBLs e/ou de carbapenemases foi realizada pela avaliação da capacidade de transferência por conjugação, segundo dois ensaios. Foram selecionados isolados representativos de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* sensíveis à estreptomicina. Como espécie receptora de plasmídeos conjugativos utilizou-se a estirpe *Escherichia coli* HB101, não fermentadora da lactose, resistente à estreptomicina.

5.6.1 – Ensaio de conjugação

Depois do crescimento em meio de cultura não selectivo, CLED ou Müller-Hinton, a 37°C *overnight*, repicou-se uma colónia da estirpe dadora para 5ml de meio de cultura líquido Trypticase Soy Broth (TSB), e em paralelo, uma colónia da estirpe receptora para 5ml de meio de cultura líquido TSB, colocou-se na estufa a 37°C *overnight*. Foram utilizados dois ensaios de conjugação para promover o encontro e obtenção de transconjugantes:

Encontro em meio sólido – No centro da placa do meio de cultura Müller-Hinton, colocou-se 200µl da suspensão da estirpe dadora em TSB e 200µl da suspensão em TSB da estirpe receptora, e homogeneizou-se. Retirou-se uma quantidade correspondente ao volume de uma ansa do crescimento obtido, após incubação a 37°C *overnight*, e colocou-se em 5ml de soro fisiológico estéril. Desta suspensão, retirou-se

200µL e plaqueou-se, pela técnica de espalhamento, em meio de cultura diferencial MacConkey agar com marcador de seleção, azida (100µg/ml) e ceftazidima (1µg/ml). O crescimento dos transconjugantes, não fermentadores da lactose com resistência à estreptomicina e ceftazidima, no referido meio de cultura selectivo, foi verificado após incubação a 37°C, ao fim de 24h e 48h.

Encontro em caldo rico – Em meio de cultura líquido rico colocou-se uma colónia da estirpe dadora e uma colónia da estirpe receptora. Após crescimento a 37°C em agitação lenta, juntou-se em meio de cultura TSB 200µl da estirpe dadora e 800µl da estirpe receptora, e colocou-se a incubar a 37°C durante 3 horas com agitação lenta. Desta suspensão, retirou-se 200µL e plaqueou-se, pela técnica de espalhamento, em meio de cultura diferencial MacConkey agar com marcador de seleção, azida (100µg/ml) e ceftazidima (1µg/ml), e colocou-se a incubar a 37°C *overnight*. O crescimento dos transconjugantes, não fermentadores da lactose com resistência à estreptomicina e ceftazidima, no referido meio de cultura selectivo, foi verificado após incubação, ao fim de 24h e 48h.

A confirmação de transferência dos genes codificadores de ESBL ou de carbapenemases nos transconjugantes foi realizada através do teste de suscetibilidade aos antibióticos para deteção de ESBLs ou verificação da redução da suscetibilidade aos carbapenemos.

5.7 – Avaliação da relação de clonalidade dos isolados por Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

A avaliação das relações de clonalidade dos isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs e de carbapenemases foi realizada pela análise dos perfis de macrorestrição com XbaI obtidos por electroforese em campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* – PFGE)

5.7.1 – Preparação do DNA para PFGE

De cultura pura em meio não selectivo, meio de cultura CLED, repicou-se uma colónia para 5ml de meio líquido não selectivo TSB, e deixou-se a crescer a 37°C

overnight. Centrifugou-se a 8000rpm, durante 4 minutos, e após rejeitar o sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* em 1ml de TBE1x (Tris Borato EDTA) (10 mM Tris:1 mM EDTA, pH 8,0). Transferiram-se 200µl de cada suspensão para tubo de microcentrifuga, e após centrifugação rejeitou-se o sobrenadante, e adicionou-se 500µl de TBE 1x. Transferiu-se 300µl da suspensão obtida anteriormente, e adicionou-se 700µl de agarose Seakem gold (Seakem Gold Agarose, Cambrex Bioscience) a 1,6% em TE *buffer* (0.8g de agarose em 50ml de TBE *buffer*), imediatamente colocada em moldes apropriados, deixando-se solidificar à temperatura ambiente durante 10-15 min. Nesta fase, a agarose foi adicionada à temperatura de 54°C para não solidificar e lisar a bactéria. Os plugs foram colocados em contacto com 4ml de solução de lise preparada adicionando num tubo de falcon: 200µl de tris1M, 400µl de EDTA a 0,5M, 800µl de sarkosyl 5%, 20µl de proteinase K (20 mg/ml) e 2.58 ml de água ultrapura estéril, obtendo-se uma solução de lise 50mM Tris, 50 mM EDTA, 1% N-lauryl-sarkosine, 0,1 mg/ml proteinase K, pH 8), ficando *overnigh* a 54°C° em banho com agitação constante e vigorosa (175-200 rpm). Posteriormente, as lavagens foram feitas a 54°C da seguinte forma: 1x com 3ml de de água ultrapura durante 10 minutos com agitação vigorosa, seguida de três vezes com 3 ml de tampão TE 1x durante 30 minutos com agitação vigorosa. Para digestão dos plugs (1/3 de plug) colocou-se em contacto com 100µl de tampão da enzima durante meia hora a 37°, substituído posteriormente por 97,5µl do mesmo tampão e 2,5µl de enzima de restrição (25U) e incubou-se a 37° *overnight*.

5.7.2 – Separação dos fragmentos de DNA por PFGE

A electroforese foi realizada em gel de agarose (Seakem Gold Agarose, Cambrex Bioscience) a 1,2% em tampão TBE 0,5X (45 mM Tris-base, 1mM EDTA, ácido bórico), no equipamento de electroforese CHEF DR III BioRad, com as seguintes condições: pulsos de 2,2-63,8s, 14°C, 6V/cm e 21h.

5.7.3 – Visualização e interpretação do perfil electroforético obtido por PFGE

Os géis foram corados com brometo de etídio (10 µg/ml) durante 30 minutos, e quando necessário, descorados com água durante 10-15 minutos com agitação suave. As imagens dos géis foram digitalizadas com no *software* ImageLab (BioRad).

As relações clonais foram estabelecidas de acordo com os critérios de Tenover e colaboradores (Tenover *et al*, 1995). De cada gel foram selecionados perfis representativos com perfil indistinguível, utilizando um representatativo de cada perfil de

cada gel para análise no InfoQuest FP versão do *software* 5,4 (Bio-Rad Laboratories). A semelhança percentual foi calculada pela aplicação do método de grupo ponderada de par com ligações médias (UPGMA), algoritmo com base no coeficiente Dice (1,0% tolerância banda; 1,0% otimização).

Resultados

1 – Seleção de isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de ESBLs e apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos de colonização fecal e responsáveis por infeções

Os isolados de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos foram obtidos no estudo de colonização fecal realizado a residentes de lares de idosos e de UCCI da região norte de Portugal e responsáveis por infeções provenientes do hospital de Braga. As instituições de prestação de cuidados de saúde na comunidade, lares de idosos e UCCI abordados no estudo, representam as principais tipologias de cuidados de saúde vocacionados à população idosa e/ou dependente da região norte de Portugal, geograficamente próximas. As UCCI situam-se no distrito de Braga, próximas do Hospital de Braga e funcionam como unidades de referência após alta hospitalar. As UCCI englobadas no estudo podem receber doentes de outras UCCI do distrito de Braga e/ou de outros distritos, de unidades hospitalares e doentes do domicílio, para prestação de cuidados de saúde.

1.1 – Seleção de isolados de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos de residentes de lares de idosos e de Unidades de Cuidados Continuados Integrados

Foram estudadas trezentas e vinte e duas amostras de fezes provenientes de residentes de sete lares de idosos do distrito de Braga e Porto e de três UCCI do distrito de Braga, no período compreendido entre Janeiro de 2008 e Fevereiro de 2012. O número de amostras de fezes estudado em cada instituição corresponde ao número de residentes independentes ou dependentes institucionalizados no período de recolha das amostras de fezes em cada instituição. Estudaram-se 248 amostras de fezes provenientes de residentes de lares de idosos, nomeadamente 9 amostras do lar de idosos 1, 21 amostras do lar de idosos 2, 37 amostras do lar de idosos 3, 25 amostras do lar de idosos 4, 51 amostras do lar de idosos 5, 41 amostras do lar de idosos 6, 64 amostras do lar de idosos 7 e 74 amostras de fezes de doentes internados em UCCI, respectivamente 19 amostras da UCCI 1, 17 amostras da UCCI 2 e 38 amostras da UCCI 3 (Tabela 4).

A inoculação das amostras de fezes, após enriquecimento em meio de BHI, em meio de cultura de MacConkey agar permitiu conhecer a densidade de bacilos de Gram negativo resistentes e não resistentes aos oximino- β -lactâmicos ou carbapenemo na flora intestinal. A avaliação do crescimento nos meios de cultura de MacConkey agar selectivo com antibiótico β -lactâmico (oximino- β -lactâmicos ou carbapenemo) permitiu seleccionar diferentes morfotipos de bacilos de Gram negativo fermentadores da lactose resistentes aos antibióticos de selecção incorporados no meio de cultura na concentração utilizada, como colonizadores do trato intestinal de cada residente. O crescimento dos isolados seleccionados foi confirmado em meio de cultura MacConkey agar suplementado com o antibiótico β -lactâmico de selecção. Esta selecção dos isolados, realizada de acordo com as características morfológicas das colónias nos quatro meios de cultura de MacConkey agar suplementado com antibiótico β -lactâmico permitiu a escolha de morfotipos representativos por amostra de fezes de cada residente (Anexo I - Avaliação Semi-quantitativa de UFC/ml).

O fenótipo de resistência aos antibióticos correspondente à produção de ESBLs e/ou redução de suscetibilidade aos carbapenemos foi detectado no teste de suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos pelo método de difusão em agar e/ou métodos fenotípicos complementares de detecção e/ou de confirmação da produção de β -lactamases.

Tabela 4 - Distribuição do número de isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de ESBLs e apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos em residentes de lares de idosos e de UCCI do distrito de Braga e do Porto

Instituição*	Distrito	Data (mês/ano)	Amostras de fezes (n=322)	Residentes colonizados (n=59)		Isolados de <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de ESBLs (n=85)		Isolados de apresentando suscetibilidade (n=6)	<i>Enterobacteriaceae</i> redução da aos carbapenemos
				Independente**	Dependente***	Independente**	Dependente***		
Lar de idosos 1	Porto	Janeiro, 2008	9	1	nd	1	nd		nd
Lar de idosos 2	Porto	Fevereiro, 2008	21	1	nd	1	nd		nd
Lar de idosos 3	Braga	Março, 2008	37	1	nd	1	nd		nd
Lar de idosos 4	Porto	Abril, 2008	25	2	nd	2	nd		nd
Lar de idosos 5	Porto	Maio-Junho, 2008	51	nd	20	nd	20		nd
Lar de idosos 6	Porto	Junho-Julho, 2008	41	nd	7	nd	7		nd
Lar de idosos 7	Braga	Março-2009	64	7	3	6	2		2
UCCI 1*	Braga	Abril, 2009	19		13		15		nd
UCCI 2*	Braga	Maio, 2009	17		6		6		nd
UCCI 3*	Braga	Janeiro-Fevereiro, 2012	38		20		20		4

Legenda: *Instituição de prestação de cuidados de saúde na comunidade vocacionada à população idosa e/ou dependente: UCCI - Unidade de Cuidados Continuados Integrados; Independente** - residente independente na realização das Actividades de Vida Diária (AVDs); Dependente*** - residente dependente nas AVDs a nível funcional, podendo apresentar diferentes graus de dependência; *Doentes internados nas UCCI foram considerados dependentes de cuidados de saúde. Os resultados de colonização por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e/ou apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos são apresentados na coluna correspondente a doentes dependentes; nd - não foi detetada colonização fecal por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e/ou apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos.

Colonização de residentes de lares de idosos e de UCCI por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e/ou apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos foi evoluindo ao longo do estudo. A detecção de colonização fecal por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs não foi relevante, nos residentes dos primeiros lares de idosos abordados no estudo, nomeadamente no lar de idosos 1, 2 e 4 do distrito do Porto e no lar de idosos 3 do distrito de Braga. Nos lares de idosos 1, 2 e 3 foi detetado um residente colonizado. No lar de idosos 4 dois residentes colonizados por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs, considerados residentes independentes, segundo informação da instituição, por não apresentarem dependência a nível funcional. Colonização fecal por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs foi relevante nas instituições posteriormente abordadas no estudo, incluindo lares de idosos, que parece estar relacionada com características de dependência dos residentes das respectivas instituições e ambiente institucional similar a unidades de internamento (Tabela 4, Figura 13).

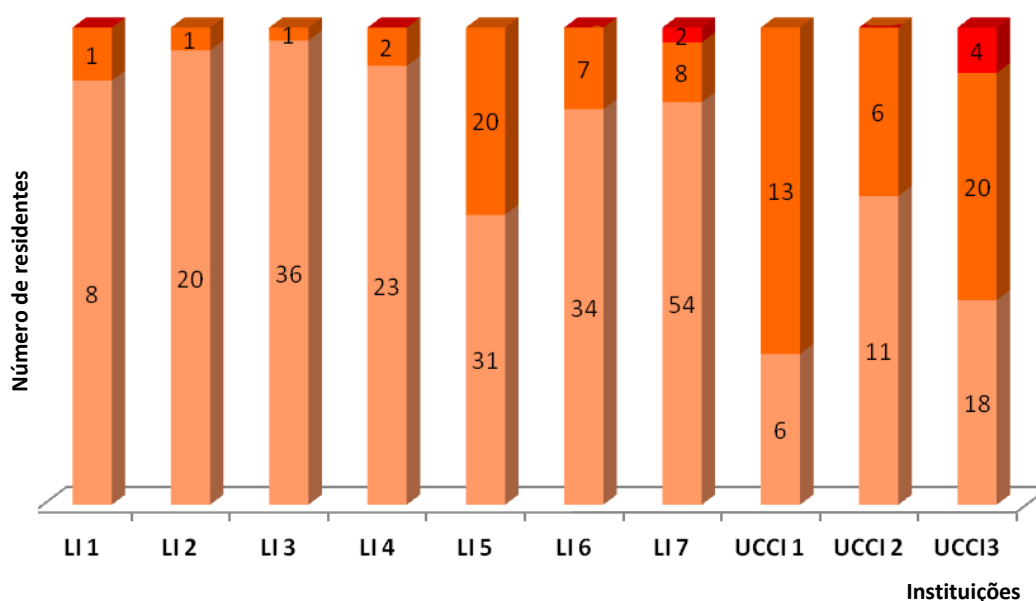


Figura 13 - Colonização fecal por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e/ou apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos em residentes de lares de idosos e de UCCI do distrito de Braga e do Porto

Legenda: O número de residentes colonizados e não colonizados é indicado no gráfico na barra correspondente a cada instituição. Residentes não colonizados por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e/ou apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos; Residentes colonizados por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs; Residentes colonizados por *Enterobacteriaceae* com redução da suscetibilidade aos carbapenemos; instituições de prestação de cuidados de saúde: LI 1 - lar de idosos 1; LI 2 - lar de idosos 2; LI 3 - lar de idosos 3; LI 4 - lar de idosos 4; LI 5 - Lar de idosos 6; LI 7 - Lar de idosos 7; UCCI 1 - Unidade de Cuidados Continuados Integrados 1; UCCI 2 - Unidade de Cuidados Continuados Integrados 2; UCCI 3 - Unidade de Cuidados Continuados Integrados 3.

A colonização por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs foi relevante nos residentes do lar de idosos 5, com a identificação de vinte residentes colonizados num total de cinquenta e uma amostras de fezes estudadas. Seguidamente, colonização fecal por estes bacilos de Gram negativo produtores de ESBLs foi considerável em residentes do lar de idosos 6, com deteção de sete residentes colonizados num global de quarenta e uma amostras de fezes. No lar de idosos 7 foram identificados oito residentes colonizados num total de sessenta e quatro amostras de fezes estudadas. Em relação, aos doentes internados nas UCCI, todos dependentes de cuidados de saúde, colonização fecal por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs também foi relevante (Tabela 4, Figura 13). Na UCCI 1 detetaram-se treze residentes colonizados, na UCCI 2 seis residentes colonizados e na UCCI 3 vinte residentes colonizados por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs num universo de dezanove, dezassete e trinta e oito amostras de fezes estudadas, respectivamente em cada UCCI. Colonização fecal por *Enterobacteriaceae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos foi detetada pela primeira vez em Março de 2009 em residentes do lar de idosos 7 e posteriormente em Fevereiro de 2012, em doentes internados na UCCI 3 com história de transferência hospitalar recente do hospital de Braga e de um hospital do centro do Porto (Tabela 4, Figura 13).

Isolados de *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases do tipo AmpC, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos foram detetados no estudo como colonizadores fecais de residentes de instituições de prestação de cuidados de saúde na comunidade à população idosa e/ou dependente da região norte de Portugal, os quais foram guardados para estudo futuro. Não descurando a importância da deteção de isolados de *Acinetobacter baumannii* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos como colonizadores fecais de residentes de lares de idosos e de UCCI do distrito de Braga e do Porto, foram caracterizados nove isolados. A caracterização dos isolados de *Acinetobacter baumannii* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos detetados em residentes de dois lares de idosos (n=7) e de uma UCCI (n=2) foi realizada em relação ao fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos e genótipo para deteção de genes codificadores das carbapenemases VIM, IMP, NDM, KPC, OXA-48, OXA-23, OXA-40, OXA-51 e OXA-58 cujos resultados foram apresentados em encontro internacional (Gonçalves *and* Ferreira, 2011; Gonçalves *et al*, 2013a).

1.1.1 – Identificação dos isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de ESBLs e/ou apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos

Diferentes espécies da família *Enterobacteriaceae* foram identificadas nos isolados produtores de ESBLs e/ou apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos do estudo de colonização fecal a residentes das diferentes instituições de prestação de cuidados de saúde na comunidade (Figura 14). *Citrobacter freundii* (n=1), *Proteus mirabilis* (n=1) e *Klebsiella oxytoca* (n=2) produtores de ESBLs foram detetados como colonizadores fecais em residentes de lares de idosos, respectivamente no lar de idosos 1, lar de idosos 2, lar de idosos 3 e no lar de idosos 4. *Escherichia coli* (n=65) e *Klebsiella pneumoniae* (n=17) produtoras de ESBLs foram as principais espécies da família *Enterobacteriaceae* detetadas como colonizadoras fecais de residentes de lares de idosos e de UCCI.

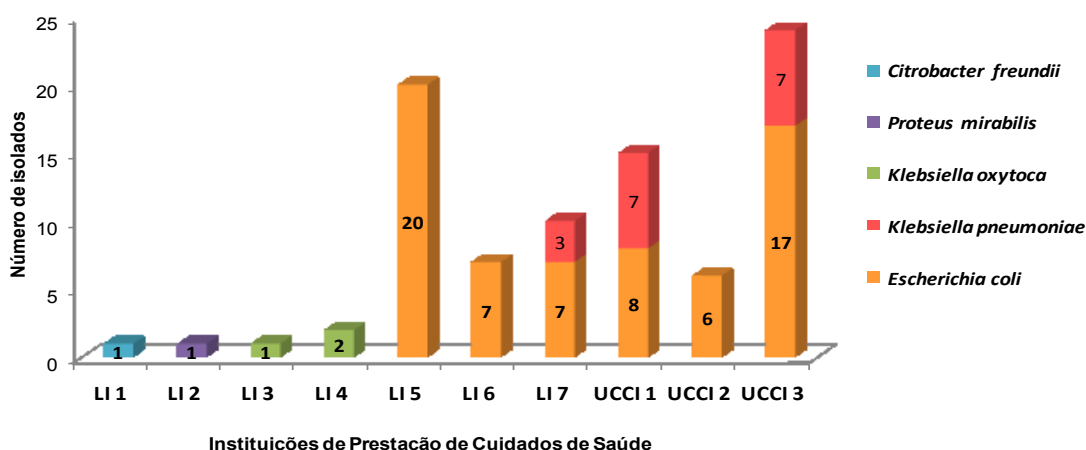


Figura 14 - Espécies da família *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e/ou com redução da suscetibilidade aos carbapenemos detetadas como colonizadores fecais em residentes de lares de idosos e de UCCI da região norte de Portugal

Legenda: LI 1 - Lar de idosos 1; LI 2 - Lar de idosos 2; LI 3 - Lar de idosos 3; LI 4 - Lar de idosos 4; LI 5 - Lar de idosos 5; LI 6 - Lar de idosos 6; LI 7 - Lar de idosos 7; UCCI 1 - Unidade de Cuidados Continuados Integrados 1; UCCI 2 - Unidade de Cuidados Continuados Integrados 2; UCCI 3 - Unidade de Cuidados Continuados Integrados 3. Os números indicados em cada barra do gráfico correspondem ao número de isolados de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e de carbapenemas detetado em cada instituição.

Isolados de *Escherichia coli* produtora de ESBL foram detetados em residentes de três lares de idosos, lar de idosos 5, lar de idosos 6 e lar de idosos 7 e em residentes das três UCCI, do distrito de Braga, UCCI 1, UCCI 2 e UCCI 3. Isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL foram detetados como colonizadores de residentes de

três instituições do distrito de Braga, nomeadamente no lar de idosos 7, UCCI 1 e UCCI 3. Isolados de *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos foram identificados no lar de idosos 7 e na UCCI 3.

Os isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs e os isolados de *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos foram selecionados para caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos e caracterização molecular de genes codificadores de β -lactamases devido à relevância como colonizadores fecais de residentes de instituições de apoio social e de prestação de cuidados de saúde na comunidade, da região norte de Portugal.

1.1.2 – *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBLs e/ou apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos em residentes de lares de idosos e de UCCI

Isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs foram detetados como colonizadores fecais de residentes de três lares de idosos do distrito de Braga e Porto, nomeadamente vinte isolados no lar de idosos 5, sete isolados no lar de idosos 6 e cinco isolados no lar de idosos 7 e em doentes internados nas três UCCI, respectivamente oito isolados na UCCI 1, seis isolados na UCCI 2 e dezassete isolados na UCCI 3. Os isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs foram identificados em residentes do lar de idosos 7 e em residentes de duas UCCI, nomeadamente sete isolados na UCCI 1 e dois isolados na UCCI 3, do distrito de Braga. Seis isolados de *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos foram identificados em dois residentes do lar de idosos 7 e em quatro doentes da UCCI 3, do distrito de Braga.

Escherichia coli produtora de ESBL é a principal espécie detetada no estudo de colonização fecal a residentes de lares de idosos e de UCCI, seguida de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL. A deteção de isolados de *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos como colonizadores fecais de residentes de instituições de prestação de cuidados de saúde no distrito de Braga é relevante do ponto de vista clínico e de saúde pública, alertando para a disseminação de carbapenemases na comunidade (Figura 15).

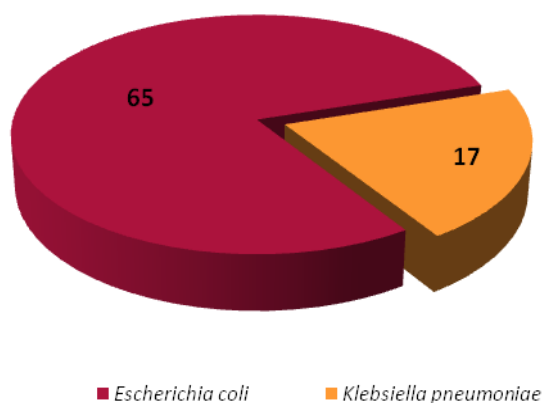


Figura 15 - Isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs e apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos detetados no estudo de colonização fecal

Legenda: O número de isolados detetados de *Escherichia coli* produtores de ESBL e de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL (n=11) e/ou apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos (n=6) é indicado no gráfico.

A colonização fecal por *Escherichia coli* e/ou *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs e/ou apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos foi detetada em residentes de instituições de apoio social e de prestação de cuidados de saúde, com número elevado de residentes dependentes, com características semelhantes a unidades de internamento hospitalar e existência de profissionais de saúde, nomeadamente enfermeiros durante vinte e quatro horas.

Nos lares de idosos 1, 2 e 4 do distrito do Porto e no lar de idosos 3 do distrito de Braga, não foram detetados residentes colonizados a nível fecal por *Escherichia coli* e/ou *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs e/ou apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos. Estas instituições apresentam características de tradicionais lares de idosos centrados em questões de apoio social e prestação de cuidados, com ambiente de proximidade dos residentes pela existência de espaços de convívio sociais e partilha do mesmo quarto. Nestas instituições não existiam ou eram poucos, os residentes dependentes de prestação de cuidados de saúde.

Em relação aos residentes dos lares de idosos 5 e 6, onde a colonização fecal por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs foi relevante, são dependentes a nível funcional para as AVDs apresentando diferentes graus de dependência com necessidade de prestação de cuidados de saúde de forma permanente. A maior parte dos residentes encontram-se com presença de dispositivos médicos invasivos como algália e sonda nasogástrica e utilizam com frequência antibióticos, nomeadamente para tratamento de

infecções do trato urinário e infecções respiratórias. Estes lares de idosos do distrito do Porto apresentam características similares às UCCI no que respeita à caracterização física da instituição, grau de dependência funcional dos residentes, presença de fatores de risco, utilização de antibióticos e prestação de cuidados de saúde por profissionais de saúde durante vinte e quatro horas nomeadamente enfermeiros e auxiliares de ação médica. Residentes destas duas instituições, em situações de agudização do estado clínico são admitidos nas unidades hospitalares contíguas aos respectivos lares de idosos. O lar de idosos 7, do distrito de Braga, apresenta uma população mista de residentes, dependentes e independentes para as AVDs, maioritariamente independentes. Esta instituição apresenta diferentes serviços de prestação de cuidados como UCCI (UCCI 1) e jardim-de-infância. A prestação de cuidados de saúde neste lar de idosos é assegurada por enfermeiros da UCCI. Os residentes desta instituição, em situações de agudização da situação clínica, são admitidos no hospital de Braga.

Colonização fecal por *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBLs foi relevante nas três UCCI abordadas no estudo. Na UCCI 1, informações individuais dos doentes não foram cedidas, no entanto doentes internados nesta unidade apresentam diferentes níveis de dependência, presença de dispositivos médico invasivos e utilização frequente de antibióticos. Em relação aos fatores de risco inerentes aos residentes da UCCI 2, foi identificado um residente colonizado por *Escherichia coli* produtora de ESBL com infeção do trato urinário, em tratamento com gentamicina. Outros residentes da instituição apresentavam sonda nasogástrica, cateter venoso periférico e cateter vesical. No período de recolha de amostras de fezes doentes internados na UCCI 3, provenientes de unidades hospitalares do distrito de Braga e Porto, de diferentes tipologias de resposta da RNCCI e do domicílio apresentam mais de 60 anos. Os doentes internados nesta unidade apresentam diversos fatores de risco como algália, presença de sonda nasogástrica, úlceras de pressão e um doente traqueostomizado. A utilização de antibióticos nesta unidade é frequente, particularmente para tratamento de infeções do trato urinário e respiratório, representando a amoxicilina com ácido clavulânico e ciprofloxacina os antibióticos mais utilizados. Em caso de agudização da situação clínica, os doentes da UCCI 1 e da UCCI 3, são admitidos no hospital de Braga e os doentes da UCCI 2, na unidade hospitalar contígua à UCCI, que faz parte da mesma instituição.

1.2 – Isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs e/ou apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos responsáveis por infeções provenientes do Hospital de Braga

Isolados responsáveis por infeções de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs e/ou apresentando redução de suscetibilidade aos carbapenemos provenientes de doentes do hospital de Braga, foram identificados no Laboratório de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica da referida unidade hospitalar.

Os isolados responsáveis por infeções de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs foram selecionados em dois períodos, correspondentes aos períodos de recolha de amostras de fezes do estudo de colonização fecal realizado a doentes internados em UCCI do distrito de Braga. Foram selecionados trinta e nove isolados de *Escherichia coli* e doze isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs no período compreendido entre Fevereiro e Maio de 2009 e vinte e um isolados de *Escherichia coli* e dezassete isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs no período compreendido entre Janeiro a Março de 2012. A seleção de isolados responsáveis por infeções de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos foi realizada de forma contínua, no período compreendido entre Fevereiro de 2009 e Dezembro de 2012.

A análise do processo clínico dos doentes permitiu verificar a idade, sexo, proveniência dos doentes aquando admissão hospital, patologia e identificar fatores de risco. Os fatores de risco identificados no conjunto de isolados, analisados de forma geral, são algaliação, presença de cateteres como cateteres urinários, cirurgia e outros fatores de âmbito exclusivo hospitalar.

1.2.1 – Isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs

Escherichia coli produtora de ESBL foi a espécie predominante (n=60) nos isolados responsáveis por infeções de doentes do hospital de Braga, selecionados em dois períodos, seguida da espécie *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL (n=29) (Figura 16). Isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs responsáveis por infeções foram isolados de diferentes produtos biológicos de doentes admitidos nos serviços do hospital de Braga.

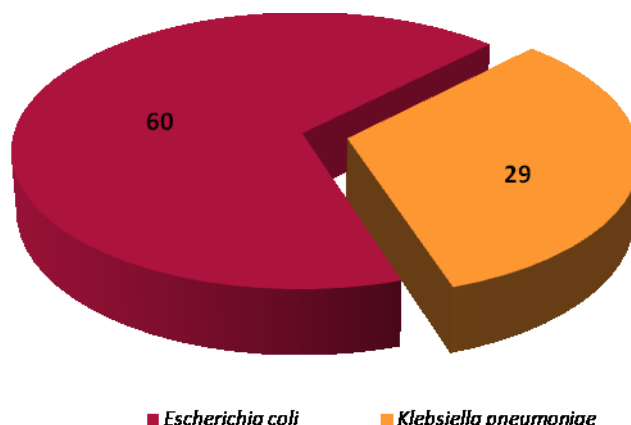


Figura 16 - Isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs responsáveis por infeções de doentes do hospital de Braga

Legenda: O número de isolados detetados de *Escherichia coli* produtores de ESBL e de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL é indicado no gráfico.

Isolados responsáveis por infeções de *Escherichia coli* foram selecionados de diferentes serviços da unidade hospitalar, nomeadamente urgência (n=11), hospital de dia (n=1), consulta urologia (n=6), consulta Medicina Física e de Reabilitação (MFR) (n=2), consulta medicina interna (n=2), consulta nefrologia (n=1), urologia (n=5), MFR (n=8), medicina interna (n=10), cirurgia (n=6), cirurgia plástica (n=1), neurologia (n=1), Unidade de Cuidados Intensivos Polivalente (UCIP) (n=3), ortopedia (n=1) e oncologia (n=1) e em diferentes produtos biológicos, designadamente urina (n=51), hemocultura (n=4), expectoração (n=1), pús (origem desconhecida) (n=1), pús perineal (n=1) e líquido perineal (n=1) (Figura 16).

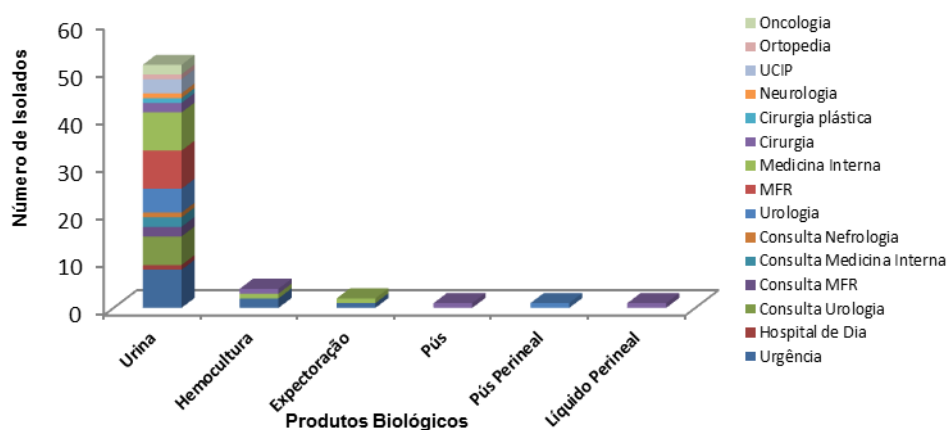


Figura 17 - Isolados de *Escherichia coli* produtora de ESBL responsáveis por infeções provenientes de doentes do hospital de Braga distribuídos por serviços e produtos biológicos
Legenda: UCIP - Unidade de Cuidados Intensivos Polivalente; MFR - Medicina Física e de Reabilitação

Isolados responsáveis por infeções de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs foram identificados em diferentes serviços do hospital de Braga, designadamente urgência (n=11), MFR (n=8), neurocirurgia (n=3), medicina interna (n=1), ortopedia (n=3), cirurgia (n=1) e consulta urologia (n=1) e em diferentes produtos biológicos, designadamente urina (n=22), exsudado uretral (n=1), zaragatoa cutânea (n=1), expectoração (n=2), aspirado brônquico (n=1) e cálculo biliar (n=1) (Figura 18).

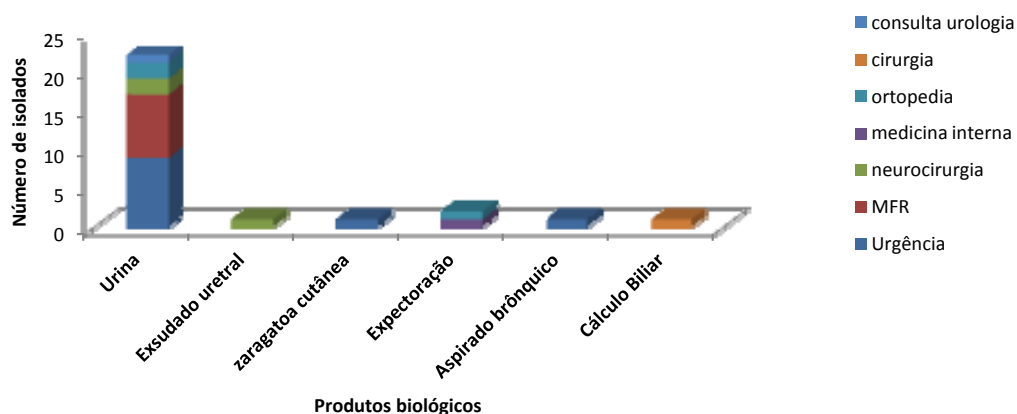


Figura 18 - Isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL responsáveis por infeções provenientes de doentes do hospital de Braga distribuídos por serviços e produtos biológicos
Legenda: MFR - Medicina Física e de Reabilitação

Isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL responsáveis por infeções foram identificados maioritariamente em amostras de urina, em doentes admitidos em diferentes serviços do hospital de Braga. Os isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBL foram isolados maioritariamente de serviços de

internamento do hospital de Braga, particularmente serviço de medicina interna, serviço de MFR e cirurgia, serviço de urgência e dos serviços de consulta externa. Os isolados responsáveis por infeções de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs foram isolados maioritariamente no serviço de urgência e nos serviços de internamento como MFR e neurocirurgia.

Isolados responsáveis por infeções de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL foram identificados de forma relevante em produtos biológicos de doentes do sexo masculino. Os isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL foram identificados de forma considerável numa população com mais de 60 anos, particularmente entre os 70 e 89 anos. Alguns dos doentes admitidos no hospital de Braga, provenientes do domicílio, encontram-se em situação de dependência elevada. Cinco doentes foram admitidos no hospital de Braga provenientes de lares de idosos, da região norte de Portugal (Tabela 5).

Tabela 5 - Distribuição dos isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL responsáveis por infeções por sexo, idade e proveniência, na admissão no hospital de Braga

Sexo, Idade e proveniência na admissão no hospital de Braga		<i>Escherichia coli</i> produtora de ESBL	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de ESBL
Sexo	F	27	7
	M	32	22
Idade	>95	0	1
	90-95	1	2
	80-89	7	4
	70-79	19	7
	60-69	9	3
	50-59	9	3
	40-49	7	7
	30-39	4	1
	20-29	2	1
	<20	1	0
Proveniência antes da admissão hospitalar	Dc	50	22
	Dc (ac)	6	4
	Lar de idosos	4	1
	UCCI	-	-
	Transferência hospitalar	-	2

Legenda: F - Feminino; M - Masculino; Dc - Domicílio; DC (ac) - acamado no domicílio; UCCI - Unidade de Cuidados Continuados Integrados.

1.2.2 – *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos

Isolados de *Klebsiella pneumoniae* e de *Escherichia coli* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos responsáveis por infeções foram identificados em doentes admitidos no hospital de Braga, entre Setembro de 2010 e Novembro de 2012. Dezanove isolados de *Klebsiella pneumoniae* e um isolado de *Escherichia coli* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos responsáveis por infeções, foram identificados em diferentes produtos biológicos de dezoito doentes admitidos nos diferentes serviços da referida unidade hospitalar (Figura 19).

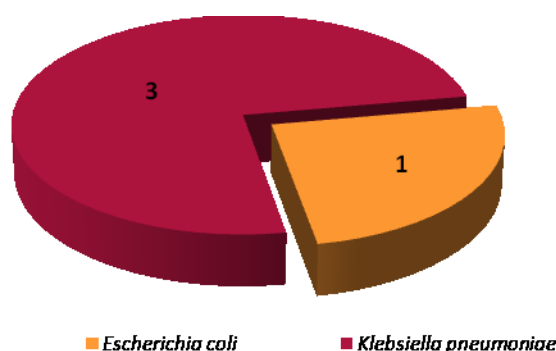


Figura 19 - *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos responsáveis por infeções de doentes do hospital de Braga

Legenda: O número de isolados detetados de *Escherichia coli* produtores e de *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos é indicado no gráfico.

Os isolados de *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos foram isolados de diferentes produtos biológicos nomeadamente urina (n=6), expectoração (n=6), aspirado brônquico (n=4), hemocultura (n=2) e pús de sutura cervical (n=1) em diferentes serviços do hospital de Braga, designadamente do serviço de medicina interna (n=7), UCIP (n=6), urgência (n=2), urologia (n=1) e neurocirurgia (n=1). O isolado de *Escherichia coli* apresentando redução de suscetibilidade aos carbapenemos foi identificado numa amostra de urina num doente internado no serviço de medicina interna.

2 – Fenótipo de resistência aos antibióticos dos isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs e/ou apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos

A caracterização fenotípica dos isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL e/ou apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos, provenientes de residentes de lares de idosos e de UCCI do distrito de Braga e Porto foi realizada através do teste de suscetibilidade pelo método de difusão em agar a diferentes e representativas classes de antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos.

A produção de ESBLs foi avaliada no método de difusão em agar através da presença de sinergismo entre o disco de oximino- β -lactâmico e o disco de amoxicilina com ácido clavulânico de acordo com diretrizes do CLSI (CLSI, 2013). Na ausência de sinergismo a deteção de ESBLs foi efetuada pelo teste de adição de ácido clavulânico ao disco de oximino- β -lactâmico com maior redução de suscetibilidade apresentada no teste de suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos e/ou pela aproximação com o disco de amoxicilina com ácido clavulânico (CLSI, 2013). No primeiro teste, um aumento igual ou superior a 5mm, no disco de oximino- β -lactâmico com ácido clavulânico comparativamente ao disco de oximino- β -lactâmico sem ácido clavulânico, e presença de sinergismo entre o disco de oximino- β -lactâmico com o disco de ácido clavulânico no segundo teste, são sugestivos da presença de isolados produtores de ESBLs. A redução de suscetibilidade aos carbapenemos foi avaliada no método de difusão em agar pela redução da suscetibilidade aos carbapenemos (imipenemo, ertapenemo e/ou meropenemo) testados (CLSI, 2013).

A identificação bioquímica e teste de suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos nos isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs e/ou apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos responsáveis por infeções provenientes do hospital de Braga foi determinada pelos sistemas automatizados Vitek e/ou Walkaway disponíveis no Laboratório de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica do hospital de Braga.

A deteção e/ou confirmação de isolados produtores de ESBLs foi realizada por E-test utilizando tiras específicas impregnadas com antibiótico β -lactâmico e inibidor das β -lactamases, nomeadamente CT/CTL, TZ/TZL e PM/PML. Os isolados de *Klebsiella pneumoniae* e de *Escherichia coli* apresentando redução da suscetibilidade aos

carbapenemos foram seleccionados por apresentarem redução da suscetibilidade a pelo menos um carbapenemo na avaliação do teste de suscetibilidade aos antibióticos.

2.1 – Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos em isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs provenientes de colonização fecal de residentes de lares de idosos

O fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos dos isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* detetados como produtores de ESBLs provenientes do estudo de colonização fecal de residentes de lares de idosos é apresentado na Tabela 6 correspondente aos isolados estudados de residentes do lar de idosos 5, Tabela 7 respectivo aos isolados de residentes do lar de idosos 6 e na Tabela 8 correspondente aos isolados de residentes do lar de idosos 7.

A deteção de sinergismo no teste de suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos pelo método de difusão em agar foi obtido na maior parte dos isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* estudados. A deteção e/ou confirmação da produção de ESBLs, pelo método de adição de ácido clavulânico ao disco de oximino- β -lactâmico, foi realizada em alguns isolados. No lar de idosos 5 identificaram-se vinte isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs, sete isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs no lar de idosos 6 e sete isolados de *Escherichia coli* e três isolados *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs no lar de idosos 7. Nos lares de idosos 5 e 6 não foram detetados residentes colonizados por *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL, contrariamente ao lar de idosos 7.

Foram detetados isolados de *Escherichia coli* com redução da suscetibilidade à cefoxitina, como demonstrado em cinco isolados de *Escherichia coli* provenientes do lar de idosos 5 (LI5-4, LI5-11, LI5-8, LI5-33 e LI3-39). Em alguns isolados de *Escherichia coli* com redução da suscetibilidade é demonstrada a presença de sinergismo, característica da produção de ESBLs, eventualmente associada à expressão de outras enzimas responsáveis pela redução da suscetibilidade à cefoxitina, como produção de AmpC ou redução da permeabilidade da membrana externa.

A avaliação do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos nos isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* estudados provenientes de residentes independentes e dependentes do lar de idosos 7, alerta para a presença de dois isolados de *Klebsiella pneumoniae* com redução da suscetibilidade aos carbapenemos. A caracterização de genes codificadores de carbapenemases nestes isolados

apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos é apresentada no ponto 5 do trabalho.

Tabela 6 - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos de isolados de *Escherichia coli* provenientes do estudo de colonização fecal no lar de idosos 5

Amostra	Isolado	MS*	Suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos (halo em mm)**									Suscetibilidade aos antibióticos não β -lactâmicos (halo em mm)***											Pesquisa de ESBLs****
			AML	AMC	TZP	CTX	CAZ	ATM	FEP	FOX	IMP	S	CN	TOB	AK	NET	NA	CIP	TE	TGC	C	F	
2	LI5-2	CTX	6	15	20	14(sy)	20(sy)	18(sy)	na	15	26	11	11	17	21	20	6	6	6	26	29	22	
4	LI5-4	ATM	6	15	18	11(sy)	14(sy)	17(sy)	na	12	26	17	10	14	18	18	6	6	6	23	28	19	
8	LI5-8	ATM	6	10	12	6	6	6(sy)	na	20	26	17	7	6	14	17	6	6	10	23	28	24	
11	LI5-11	CTX	6	6	13	6	6	10	na	6	25	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	11	>30	>30	>30	$\Delta^{CTX/CLAV}$ 7
12	LI5-12	CTX	6	12	13	6(sy)	12(sy)	9(sy)	na	20	28	17	7	6	14	17	6	6	10	23	28	24	
17	LI5-17	ATM	6	10	13	6	11(sy)	9(sy)	na	20	26	10	>30	>30	>30	8	6	6	6	>30	21	na	
18	LI5-18	CTX	6	8	13	17	15	21	na	9	25	13	>30	>30	>30	17	20	22	11	>30	22	na	$\Delta^{CTX/CLAV}$ 6
22	LI5-22	CAZ	6	10	18	6(sy)	12(sy)	9(sy)	na	20	26	17	8	10	17	18	6	6	8	19	28	22	
26	LI5-26	CAZ	6	10	11	7(sy)	12(sy)	10(sy)	na	26	28	17	6	9	14	16	6	6	8	22	26	21	

Legenda: MS* - meio de seleção de MacConkey agar com antibiótico β -lactâmico: CAZ - ceftazidima (2 μ g/ml), CTX - cefotaxima (2 μ g/ml), ATM - aztreonam (2 μ g/ml); ** antibióticos β -lactâmicos: AML - ampicilina, AMC - amoxicilina com ácido clavulânico, TZP - piperacilina/tazobactam, CTX - cefotaxima, CAZ - ceftazidima, ATM - aztreonam, FEP - cefepime, FOX - ceftoxitina, IMP - imipenem; *** antibióticos não β -lactâmicos: S - estreptomicina, CN - gentamicina, TOB - tobramicina, AK - amicacina, NET - netilmicina, NA - ácido nalidíxico, CIP - ciprofloxacina, TE - tetraciclina, TGC - tigeciclina, C - cloranfenicol, F - nitrofurantoína; **** - detecção da produção de ESBLs pelo método de adição de ácido clavulânico ao disco de oxímimo- β -lactâmico com maior redução de suscetibilidade: $\Delta^{CTX/CLAV}$ - diferença entre o halo de inibição de cefotaxima e o halo de inibição de cefotaxima com ácido clavulânico; sy - sinergismo entre o oxímimo- β -lactâmico e amoxicilina com ácido clavulânico; >30mm - halo de inibição superior a 30mm; Avaliação qualitativa da resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos segundo diretrizes do CLSI (2013): **Isolado resistente**; **Isolado com sensibilidade intermédia**; **Isolado sensível**; na - antibiótico não avaliado no teste de suscetibilidade aos antibiótico

Tabela 6 (continuação) - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos de isolados de *Escherichia coli* provenientes do estudo de colonização fecal no lar de idosos 5

Amostra	Isolado	MS*	Suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos (halo em mm)**										Suscetibilidade aos não β -lactâmicos (halo em mm)***										Pesquisa de ESBLs****
			AML	AMC	TZP	CTX	CAZ	ATM	FEP	FOX	IMP	S	CN	TOB	AK	NET	NA	CIP	TE	TGC	C	F	
33	LI5-33	CTX	6	22	11	12	12(sy)	6(sy)	10(sy)	7	36	18	10	11	16	19	6	6	11	24	>30	23	
34	LI5-34	ATM	6	24	13	6	12(sy)	6(sy)	11(sy)	24	36	11	na	na	na	11	7	6	6	na	20	19	
36	LI5-36	CAZ	6	7	13	6	12(sy)	9(sy)	14(sy)	25	36	17	8	8	13	16	6	6	9	25	27	23	
37	LI5-37	ATM	6	9	12	8(sy)	14(sy)	12(sy)	12(sy)	24	26	16	9	7	13	15	6	9	8	23	27	20	
38	LI5-38	ATM	6	19	15	7(sy)	16(sy)	15(sy)	16(sy)	22	32	na	9	12	17	19	6	10	6	20	26	25	
39	LI5-39	CTX	6	20	17	6	18	6	12(sy)	6	38	18	11	13	19	20	6	6	7	21	28	25	
40	LI5-40	ATM	6	24	16	6	8(sy)	6(sy)	11(sy)	19	36	16	9	11	17	17	6	6	8	22	28	23	
41	LI5-41	CAZ	6	16	13	8(sy)	14(sy)	7(sy)	11(sy)	22	26	17	7	6	14	17	6	6	10	23	28	24	
42	LI5-42	CAZ	6	26	13	6(sy)	13(sy)	6	12(sy)	25	20	17	7	6	14	17	6	6	10	23	28	24	
43	LI5-43	CAZ	6	10	17	8(sy)	14(sy)	12	10(sy)	22	>30	18	10	13	17	20	6	6	8	21	>30	23	
51	LI5-51	CTX	6	11	21	28(sy)	30(sy)	15(sy)	32(sy)	32	30	6	7	10	21	17	6	11	6	20	6	19	

Legenda: MS* - meio de seleção de MacConkey agar com antibiótico β -lactâmico: CAZ - ceftazidima (2 μ g/ml), CTX - cefotaxima (2 μ g/ml), ATM - aztreonam (2 μ g/ml); ** antibióticos β -lactâmicos: AML - ampicilina, AMC - amoxicilina com ácido clavulânico, TZP - piperacilina/tazobactam, CTX - cefotaxima, CAZ - ceftazidima, ATM - aztreonam, FEP - cefepime, FOX - ceftoxitina, IMP - imipenem; *** antibióticos não β -lactâmicos: S - estreptomicina, CN - gentamicina, TOB - tobramicina, AK - amikacina, NET - netilmicina, NA - ácido nalidíxico, CIP - ciprofloxacina, TE - tetraciclina, TGC - tigeciclina, C - cloranfenicol, F - nitrofurantoína; **** - detecção da produção de ESBLs pelo método de adição de ácido clavulânico ao disco de oximino- β -lactâmico com maior redução de suscetibilidade: $\Delta_{CTX/CLAV}$ - diferença entre o halo de inibição de cefotaxima e o halo de inibição de cefotaxima com ácido clavulânico; sy - sinergismo entre o oximino- β -lactâmico e amoxicilina com ácido clavulânico; >30mm - halo de inibição superior a 30mm; Avaliação qualitativa da resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos segundo diretrizes do CLSI (2013): **Isolado resistente**; **Isolado com sensibilidade intermédia**; **Isolado sensível**; na - antibiótico não avaliado no teste de suscetibilidade aos antibióticos

Tabela 7 – Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos de isolados de *Escherichia coli* provenientes do estudo de colonização fecal no lar de idosos 6

Isolado	MS*	Suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos (halo em mm)**									Suscetibilidade aos antibióticos não β -lactâmicos (halo em mm)***										
		AML	AMC	TZP	CTX	CAZ	ATM	FEP	FOX	IMP	S	CN	TOB	AK	NET	NA	CIP	TE	TGC	C	F
LI6-7	CTX	6	11	20	7(sy)	12(sy)	12(sy)	14(sy)	26	30	18	9	11	17	20	6	6	10	23	30	25
LI6-12	ATM	6	11	20	20(sy)	14(sy)	16(sy)	24(sy)	26	30	18	9	11	17	20	6	6	10	23	30	25
LI6-17	CTX	6	22	20	22(sy)	16(sy)	16(sy)	18(sy)	24	26	16	20	22	18	15	6	22	22	22	>30	17
LI6-18	ATM	6	15	20	7(sy)	10(sy)	12(sy)	12(sy)	24	28	18	9	13	18	19	6	6	10	22	28	26
LI6-19	CTX	6	11	18	6	11(sy)	9(sy)	10(sy)	25	27	18	9	11	17	20	6	6	10	23	30	25
LI6-34	CTX	6	18	20	8(sy)	16(sy)	14(sy)	15(sy)	24	26	18	9	11	17	20	6	6	10	23	30	25
LI6-38	CTX	6	>30	20	7(sy)	16(sy)	6(sy)	11(sy)	26	36	14	8	12	16	17	6	6	11	23	28	19

Legenda: MS* - meio de seleção de MacConkey agar com antibiótico β -lactâmico: CTX - cefotaxima (2 μ g/ml), ATM - aztreonamo (2 μ g/ml); ** antibióticos β -lactâmicos: AML - ampicilina, AMC - amoxicilina com ácido clavulânico, TZP - piperaciclina/tazobactam, CTX - cefotaxima, CAZ - ceftazidima, ATM - aztreonamo, FEP - cefepime, FOX - ceftoxitina, IMP - imipenemo; *** antibióticos não β -lactâmicos: S - estreptomicina, CN - gentamicina, TOB - tobramicina, AK - amikacina, NET - netilmicina, NA - ácido nalidíxico, CIP - ciprofloxacina, TE - tetraciclina, TGC - tigeciclina, C - cloranfenicol, F - nitrofurantoína; sy - sinergismo entre o oximino- β -lactâmico e amoxicilina com ácido clavulânico; >30mm - halo de inibição superior a 30mm; Avaliação qualitativa da resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos segundo directrizes do CLSI (2013): Isolado resistente; Isolado com sensibilidade intermédia; Isolado sensível; na - antibiótico não avaliado no teste de suscetibilidade aos antibióticos

Tabela 8 – Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos de isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* provenientes do estudo de colonização fecal no lar de idosos 7

Amostra	Isolado	MS*	Aut♦	Identificação	Suscetibilidade aos antibióticos β-lactâmicos (halo em mm) **								Suscetibilidade aos antibióticos não β-lactâmicos (halo em mm) ***											Pesquisa de ESBLs****		
					AML	AMC	TZP	CTX	CAZ	FEP	ATM	IPM	FOX	S	CN	TOB	AK	NET	NA	CIP	TE	TGC	C		F	T/S
1	LI7-1	CAZ	Dep	Escherichia coli	6	6	13	6	6	25	11	23	6	15	19	9	22	15	6	19	22	22	24	17	30	Δ CAZ/CLAV 8
3	LI7-3	CTX	Dep	Klebsiella pneumoniae	6	6	na	13	9	20	13	18	6	15	19	9	22	15	6	19	22	22	24	17	30	Δ CAZ/CLAV 8
4	LI7-4	CAZ	Dep	Escherichia coli	6	6	24	30	24	26	28	24	24	16	22	22	24	na	6	10	26	26	30	26	6	Δ CAZ/CLAV 9
5	LI7-5	CAZ	Ind	Escherichia coli	6	7	24	16	16	19	15(sy)	30	25	14	24	21	24	24	24	34	8	20	26	18	na	
6	LI7-6	ATM	Ind	Klebsiella pneumoniae	6	10	21	11	15(sy)	14(sy)	14(sy)	27	23	na	10	12	22	17	16	15	8	19	24	14	6	
18	LI7-18	CTX	Ind	Escherichia coli	6	8	22	12(sy)	12(sy)	10(sy)	8(sy)	24	16	7	12	12	19	17	6	6	6	22	27	16	na	
24	LI7-24	CAZ	Ind	Escherichia coli	6	7	17	22	17	30	24	25	8	12	22	22	9	24	6	25	9	21	9	22	13	Δ CAZ/CLAV 5
38	LI7-38	ATM	Ind	Klebsiella pneumoniae	6	6	26	13	13	28	22	6	6	>30	22	21	25	na	>30	>30	26	21	26	22	30	Δ ATM/CLAV 5
51	LI7-51	CAZ	Ind	Escherichia coli	6	16	17	32(sy)	23	30	30	28	24	15	19	9	22	15	6	19	22	22	24	17	30	
57	LI7-57	CTX	Ind	Escherichia coli	6	13	26	18(sy)	28	24(sy)	26(sy)	26	34	18	21	24	24	26	>30	>30	26	24	24	22	6	

Legenda: MS* - meio de seleção de MacConkey agar com antibiótico β -lactâmico: CAZ - ceftazidima (2 μ g/ml), CTX - cefotaxima (2 μ g/ml), ATM - aztreonamo (2 μ g/ml); Aut* - grau de autonomia a nível funcional do residente do lar de idosos, segundo indicações da instituição: Ind - independente, Dep – dependente; ** antibióticos β -lactâmicos: AML - ampicilina, AMC - amoxicilina com ácido clavulânico, TZP - piperacilina/tazobactam, CTX - cefotaxima, CAZ - ceftazidima, ATM - aztreonamo, FEP - cefepime, FOX - ceftoxitina, IMP - imipenemo; *** antibióticos não β -lactâmicos: S - estreptomicina, CN - gentamicina, TOB - tobramicina, AK - amicacina, NET - netilmicina, NA - ácido nalidíxico, CIP - ciprofloxacina, TE - tetraciclina, TGC - tigeciclina, C - cloranfenicol, F – nitrofurantoína, T/S - trimetoprim/sulfametoxazol; **** - detecção da produção de ESBLs pelo método de adição de ácido clavulânico ao disco de oximino- β -lactâmico com maior redução de suscetibilidade: $\Delta^{CTX/CLAV}$ - diferença entre o halo de inibição de ceftazidima e o halo de inibição de ceftazidima com ácido clavulânico, $\Delta^{ATM/CLAV}$ - diferença entre o halo de inibição de aztreonamo e o halo de inibição de aztreonamo com ácido clavulânico; sy - sinergismo entre o oximino- β -lactâmico e amoxicilina com ácido clavulânico; >30mm - halo de inibição superior a 30mm; Avaliação qualitativa da resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos segundo directrizes do CLSI (2013): Isolado resistente; Isolado com sensibilidade intermédia; Isolado sensível; na - antibiótico não avaliado no teste de suscetibilidade aos antibiótico

2.2 – Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos em isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs provenientes de colonização fecal de residentes de UCCI

A caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos dos isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* detetados como produtores de ESBLs (n=39) provenientes do estudo de colonização fecal de residentes de UCCI do distrito de Braga é apresentado nas Tabela 9, correspondente aos isolados estudados de residentes da UCCI 1, Tabela 10 respectivo aos isolados de residentes da UCCI 2 e na Tabela 11 correspondente aos isolados de residentes da UCCI 3. Como evidenciado nos isolados estudados dos lares de idosos, a deteção de sinergismo no teste de suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos pelo método de difusão em agar foi detetada na maior parte dos isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae*. A deteção e/ou confirmação da produção de ESBLs, pelo método de adição de ácido clavulânico ao disco de oximino- β -lactâmico, foi realizada em alguns isolados, particularmente da UCCI 3.

Na UCCI 1 identificaram-se nove isolados de *Escherichia coli* e seis *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs, seis isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs na UCCI 2 e dezassete isolados de *Escherichia coli* e três *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs na UCCI 3. Na UCCI 2 não foram detetados residentes colonizados por *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL, contrariamente às UCCI 1 e UCCI 3. Identificaram-se 18 isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs, 10 em doentes internados na UMDR, 7 na ULDM e 1 doente na UCP, e 7 isolados de *Klebsiella pneumoniae*, em 3 doentes internados na UMDR e 4 na ULDM. Além dos isolados produtores de ESBLs, foram identificados quatro isolados de *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos.

Co-colonização por *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBLs foi verificada em residentes de UCCI, nomeadamente em dois residentes da UCCI 1, correspondentes às amostras 2 e 7, e num residente da UCCI 3, internado na UMDR, correspondente à amostra 35. Dois doentes da UCCI 3, um internado na UMDR e o outro na ULDM, apresentaram co-colonização por *Escherichia coli* produtora de ESBL e *Klebsiella pneumoniae* com redução da suscetibilidade aos carbapenemos (amostras 22 e 31) e um doente internado na ULDM co-colonizado por duas estirpes de *Klebsiella*

pneumoniae (amostra 34), uma produtora de ESBL e a outra com redução da suscetibilidade aos carbapenemos.

A análise da proveniência dos doentes, antes da admissão na UCCI 3, permitiu verificar que quatro doentes são provenientes do domicílio, residentes no distrito de Braga se encontram colonizados por *Escherichia coli* produtora de ESBLs. Nove doentes foram transferidos do hospital de Braga, internados no serviço de medicina interna e ortopedia, três doentes transferidos de outras unidades hospitalares do distrito de Braga e Porto e quatro doentes provenientes de UCCI da RNCCI com história de internamentos hospitalares no hospital de Braga.

Tabela 9 - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos de isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* provenientes do estudo de colonização fecal na UCCI 1

Amostra	MS*	Isolado	I/S♦	Identificação	Suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos (halo em mm)**								Suscetibilidade aos antibióticos não β -lactâmicos (halo em mm)***												
					AML	AMC	TZP	CTX	CAZ	FEP	ATM	IPM	FOX	S	CN	TOB	AK	NET	NA	CIP	TE	TGC	C	F	T/S
1	CAZ	UC1-23	50, M	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	7	20	11(sy)	14(sy)	15	14	28	24	7	10	9	20	16	6	6	7	19	22	18	na
2	CAZ	UC1-37	67, F	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	12	16	7(sy)	10(sy)	10(sy)	7(sy)	28	20	>30	22	12	22	22	>30	30	>30	18	24	14	>30
		UC 1- 11		<i>Escherichia coli</i>	6	11	22	7(sy)	10(sy)	10(sy)	7(sy)	28	19	10	6	9	18	na	6	6	6	20	20	24	6
4	CAZ	UC1-19	84, F	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	12	21	22(sy)	20(sy)	22(sy)	24	>30	22	7	20	19	21	na	7	17	10	20	7	9	7
5	ATM	UC1-16	74, F	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	11	16	10	13	24(sy)	15(sy)	>30	28	>30	22	12	22	22	>30	30	>30	18	24	14	>30
6	CAZ	UC1-33	57, F	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	16	16	12(sy)	18(sy)	18(sy)	16(sy)	>30	26	>30	22	12	22	22	>30	30	>30	18	24	14	>30
7	CTX	UC1-18	52, M	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	14	16	6(sy)	14(sy)	11(sy)	10(sy)	>30	22	>30	22	12	22	22	>30	30	>30	18	24	14	>30
		UC1-34		<i>Escherichia coli</i>	6	14	20	6(sy)	13(sy)	12(sy)	8(sy)	>30	24	na	11	12	22	17	11	17	7	18	25	13	6

Legenda: MS* - meio de seleção de MacConkey agar com antibiótico β -lactâmico: CAZ - ceftazidima (2 μ g/ml), CTX - cefotaxima (2 μ g/ml), ATM - aztreonamo (2 μ g/ml); I/S♦ - idade/sexo; ** antibióticos β -lactâmicos: AML - ampicilina, AMC - amoxicilina com ácido clavulânico, TZP - piperacilina/tazobactam, CTX - cefotaxima, CAZ - ceftazidima, FEP - cefepime, ATM - aztreonamo, FOX - ceftazidima, IMP - imipenem; *** antibióticos não β -lactâmicos: S - estreptomicina, CN - gentamicina, TOB - tobramicina, AK - amikacina, NET - netilmicina, NA - ácido nalidíxico, CIP - ciprofloxacina, TE - tetraciclina, TGC - tigeciclina, C - cloranfenicol, F - nitrofurantoína; T/S - trimetoprim/sulfametoxazol; sy - sinergismo entre o oximino- β -lactâmico e amoxicilina com ácido clavulânico; >30mm - halo de inibição superior a 30mm; Avaliação qualitativa da resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos segundo directrizes do CLSI (2013): **Isolado resistente**; **Isolado com sensibilidade intermédia**; **Isolado sensível**; na - antibiótico não avaliado no teste de suscetibilidade aos antibióticos.

Tabela 9 (continuação) - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos de isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* provenientes do estudo de colonização fecal na UCCI 1

Amostra	MS*	Isolado	Idade/ Sexo	Identificação	Suscetibilidade aos antibióticos β-lactâmicos (halo em mm)**								Suscetibilidade aos antibióticos não β-lactâmicos (halo em mm)***												
					AML	AMC	TZP	CTX	CAZ	FEP	ATM	IPM	FOX	S	CN	TOB	AK	NET	NA	CIP	TE	TGC	C	F	T/S
10	CTX	UC1-15	80, M	Escherichia coli	6	13	20	6(sy)	11(sy)	10(sy)	7(sy)	26	24	6	6	9	19	15	6	6	6	23	27	20	6
11	CAZ	UC1-17	82, M	Escherichia coli	6	7	17	6	12(sy)	7	6	32	25	na	6	6	18	15	6	6	6	20	22	21	6
12	CAZ	UC1-26	84, F	Escherichia coli	6	8	19	22	18	26	16(sy)	26	22	6	20	12	21	15	6	9	6	23	6	20	6
13	CTX	UC1-20	87, F	Escherichia coli	6	12	24	6	9	7(sy)	6(sy)	26	22	16	23	22	26	na	6	12	26	24	30	24	6
14	CTX	UC1-108	52, M	Klebsiella pneumoniae	6	22	23	20(sy)	14(sy)	22(sy)	13(sy)	28	26	15	16	12	21	15	7	12	7	19	7	15	17
16	CAZ	UC1-35	74, M	Escherichia coli	6	17	25	24(sy)	14(sy)	22	9(sy)	26	24	na	24	na	25	20	6	8	7	20	6	21	6
19	ATM	UC1-109	34, M	Escherichia coli	6	20	25	24(sy)	26(sy)	20(sy)	24(sy)	28	26	11	20	20	23	na	6	20	12	20	8	20	6

Legenda: MS* - meio de seleção de MacConkey agar com antibiótico β -lactâmico: CAZ - ceftazidima (2 μ g/ml), CTX - cefotaxima (2 μ g/ml), ATM - aztreonamo (2 μ g/ml); I/S♦ - idade/sexo; ** antibióticos β -lactâmicos: AML - ampicilina, AMC - amoxicilina com ácido clavulânico, TZP - piperacilina/tazobactam, CTX - cefotaxima, CAZ - ceftazidima, FEP - cefepime, ATM - aztreonamo, FOX - cefoxitina, IMP - imipenemo; *** antibióticos não β -lactâmicos: S - estreptomicina, CN - gentamicina, TOB - tobramicina, AK - amikacina, NET - netilmicina, NA - ácido nalidíxico, CIP - ciprofloxacina, TE - tetraciclina, TGC - tigeciclina, C - cloranfenicol, F - nitrofurantoína; T/S - trimetoprim/sulfametoxazol; sy - sinergismo entre o oximino- β -lactâmico e amoxicilina com ácido clavulânico; >30mm - halo de inibição superior a 30mm; Avaliação qualitativa da resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos segundo directrizes do CLSI (2013): **Isolado resistente;** **Isolado com sensibilidade intermédia;** **Isolado sensível;** na - antibiótico não avaliado no teste de suscetibilidade aos antibióticos.

Tabela 10 - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos de isolados de *Escherichia coli* provenientes do estudo de colonização fecal na UCCI 2

Amostra	Isolado	MS*	I/S♦	Informação Clínica	Suscetibilidade aos antibióticos β-lactâmicos (halo em mm)**								Suscetibilidade aos antibióticos não β-lactâmicos (halo em mm)***												
					AML	AMC	TZP	CTX	CAZ	ATM	FEP	IPM	FOX	S	CN	TOB	AK	NET	NA	CIP	TE	TGC	C	F	T/S
2	UC2-2	ATM	85, F	Hipercaliemia	6	8	14	6(sy)	13(sy)	8(sy)	12(sy)	34	26	16	22	15	22	19	6	6	7	23	6	7	6
4	UC2-4	CTX	97, M	AVC, ITU	6	9	14	6(sy)	15(sy)	12(sy)	15(sy)	32	32	16	22	15	22	19	6	6	7	23	6	7	6
9	UC2-9	CTX	86, F	Diabetes mellitus	6	9	22	6(sy)	15(sy)	12(sy)	15(sy)	32	32	14	8	8	19	15	6	6	7	22	26	22	30
10	UC2-10	CAZ	81, F	Demência	6	9	19	6(sy)	15(sy)	12(sy)	15(sy)	32	32	7	na	10	22	18	6	6	6	22	24	24	6
11	UC2-11	CTX	83, F	AVC, anemia	8	6	14	6	11(sy)	6	12	30	20	16	22	15	22	19	6	6	7	23	6	7	6
12	UC2-12	CAZ	87, F	Alzheimer, dislipidemia	6	7	23	10(sy)	18(sy)	15(sy)	18(sy)	32	26	6	8	9	20	na	6	6	12	24	23	24	6

Legenda: MS* - meio de seleção de MacConkey agar com antibiótico β -lactâmico: CAZ - ceftazidima (2 μ g/ml), CTX - cefotaxima (2 μ g/ml), ATM - aztreonamo (2 μ g/ml); I/S♦ - idade/sexo; ** antibióticos β -lactâmicos: AML - ampicilina, AMC - amoxicilina com ácido clavulânico, TZP - piperacilina/tazobactam, CTX - cefotaxima, CAZ - ceftazidima, FEP - cefepime, ATM - aztreonamo, FOX - cefoxitina, IMP - imipenemo; *** antibióticos não β -lactâmicos: S - estreptomicina, CN - gentamicina, TOB - tobramicina, AK - amikacina, NET - netilmicina, NA - ácido nalidíxico, CIP - ciprofloxacina, TE - tetraciclina, TGC - tigeciclina, C - cloranfenicol, F - nitrofurantoína; T/S - trimetoprim/sulfametoxazol; sy - sinergismo entre o oximino- β -lactâmico e amoxicilina com ácido clavulânico; >30mm - halo de inibição superior a 30mm; AVC - acidente vascular cerebral, ITU - Infecção do trato urinário; Avaliação qualitativa da resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos segundo diretrizes do CLSI (2013): **Isolado resistente**; **Isolado com sensibilidade intermédia**; **Isolado sensível**; na - antibiótico não avaliado no teste de suscetibilidade aos antibióticos.

Tabela 11 - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β-lactâmicos e não β-lactâmicos de isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* provenientes do estudo de colonização fecal na UCCI 3

Amostra	Isolado (Data)	MS	I/S♦	Origem•	Identificação	Suscetibilidade aos antibióticos β-lactâmicos (halo em mm)**										Suscetibilidade aos antibióticos β-lactâmicos (halo em mm)***												Pesquisa de ESBLs****
						AML	AMC	TZP	CTX	CAZ	ATM	FEP	FOX	IPM	S	CN	TOB	AK	NE T	NA	CIP	TE	TGC	C	F	T/S		
21	UC3-67 (MDR)	CTX	74,M	HospA/Ort*	Escherichia coli	11	20	27	10(sy)	20(sy)	15(sy)	17(sy)	24	32	7	17	19	na	21	6	7	6	19	25	21	na		
22	UC3-53 (MDR)	ATM	63,F	HB/Med Int	Escherichia coli	12	15	18	11(sy)	18(sy)	13(sy)	23(sy)	23	28	7	8	8	na	17	6	6	6	na	22	20	6		
	UC3-22	MRP			Klebsiella pneumoniae	6	7	17	13	16	15	17	7	11	6	13	13	na	na	10	9	14	18	15	na	6		
20	UC3-57 (MDR)	CAZ	79,F	HospB/Orp*	Escherichia coli	10	19	25	11(sy)	15(sy)	18(sy)	20(sy)	20	30	7	18	19	21	23	6	6	6	21	25	22	6		
7	UC3-80 (MDR)	CTX	89,M	HB/Med Int	Escherichia coli	6	8	na	9	14	11	15	20	30	7	18	19	21	23	6	6	6	21	25	22	6	Δ CTX/CTX+ CLAV 12	
26	UC3-60 (MDR)	CTX	90,F	HB/Ort + UCCJ**	Escherichia coli	12	17	19	15(sy)	18(sy)	12(sy)	17(sy)	30	30	6	9	10	na	17	6	6	6	na	25	19	6		
25	UC3-52 (MDR)	CTX	78,F	HB/Med Int + UCCJ**	Escherichia coli	15	15	23	18(sy)	26(sy)	24(sy)	26(sy)	28	34	12	21	9	19	na	6	6	24	25	6	22	6		
33	UC3-39 (MDR)	ATM	60,F	HB/Onc	Escherichia coli	13	16	20	12(sy)	14(sy)	13(sy)	16(sy)	22	28	6	7	7	18	15	6	6	6	21	6	17	6		

Legenda: MS* - meio de seleção de MacConkey agar com antibiótico β-lactâmico: CAZ - ceftazidima (2μg/ml), CTX - cefotaxima (2μg/ml), ATM - aztreonamo (2μg/ml); I/S♦ - idade/sexo; ** antibióticos β-lactâmicos: AML - ampicilina, AMC - amoxicilina com ácido clavulânico, TZP - piperacilina/tazobactam, CTX - cefotaxima, CAZ - ceftazidima, FEP - cefepime, ATM - aztreonamo, FOX - cefoxitina, IMP - imipenemo; *** antibióticos não β-lactâmicos: S - estreptomicina, CN - gentamicina, TOB - tobramicina, AK - amikacina, NET - netilmicina, NA - ácido nalidixico, CIP - ciprofloxacina, TE - tetraciclina, TGC - tigeciclina, C - cloranfenicol, F - nitrofurantoína; T/S - trimetoprim/sulfametoxazol; sy - sinergismo entre o oximino-β-lactâmico e amoxicilina com ácido clavulânico; >30mm - halo de inibição superior a 30mm; **** - detecção da produção de ESBLs, pelo método de adição de ácido clavulânico ao disco de oximino-β-lactâmico com maior redução de suscetibilidade: Δ^{CTX/CLAV} - diferença entre o halo de inibição de cefotaxima e o halo de inibição de cefotaxima com ácido clavulânico, Δ^{ATM/CLAV} - diferença entre o halo de inibição de aztreonamo e o halo de inibição de aztreonamo com ácido clavulânico; MDR - Média Duração e Reabilitação, LDM - Longa Duração e Manutenção, CP - Cuidados Paliativos; **Origem•** - HospA/Orp - referenciado pelo Hospital A (distrito de Braga), serviço de Ortopedia; HB/Med Int - referenciado do Hospital de Braga, serviço de medicina interna; HospB/Orp - referenciado pelo Hospital B (distrito de Braga), serviço de Ortopedia; HB/Ort + UCCI** - doente internado por longo período no hospital de Braga, referenciado para a UCCI contemplada no estudo de colonização fecal (UCCI 2); HB/Onc - Hospital de Braga - serviço de oncologia; HB/Neur - hospital de Braga - neurologia; Hosp C, D, E - transferência inter-hospitalar, por curto período (hospital C - distrito de Braga, hospital D e E - distrito do Porto); Dc - utente residente no domicílio, referenciado para a UCCI pela Unidade de Saúde Familiar da área de residência (distrito de Braga). Avaliação qualitativa da resistência aos antibióticos β-lactâmicos e não β-lactâmicos segundo directrizes do CLSI (2013): **Isolado resistente**; **Isolado com sensibilidade intermédia**; **Isolado sensível**; na - antibiótico não avaliado no teste de suscetibilidade aos antibióticos.

Tabela 11 (continuação) - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos de isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* provenientes do estudo de colonização fecal na UCCI 3

Amostra	Isolado (Data)	MS	I/S	Origem	Identificação	Suscetibilidade aos antibióticos β-lactâmicos (halo em mm)**										Suscetibilidade aos antibióticos β-lactâmicos (halo em mm)***												Pesquisa de ESBLs****
						AML	AMC	TZP	CTX	CAZ	ATM	FEP	FOX	IPM	S	CN	TOB	AK	NET	NA	CIP	TE	TGC	C	F	T/S		
23	UC3-47 (MDR)	ATM	86,M	Dc	Escherichia coli	10	14	23	8(sy)	14(sy)	12(sy)	15(sy)	26	28	14	11	11	22	na	6	6	6	22	28	22	6		
35	UC3-42 (MDR)	CAZ	78,M	HB/Med + UCCI**	Escherichia coli	8	18	na	11(sy)	14(sy)	12(sy)	16(sy)	20	28	6	7	7	na	15	6	6	6	na	6	17	6		
	UC3-41 (MDR)				Klebsiella pneumoniae	14	17	24	14(sy)	17(sy)	13(sy)	17(sy)	23	32	6	19	20	na	21	6	7	6	na	25	22	6		
27	UC3-64 (MDR)	CAZ	82,F	HB/Ort	Klebsiella pneumoniae	11	14	na	12(sy)	15(sy)	15(sy)	19(sy)	20	28	7	17	20	na	21	6	7	6	na	25	22	6		
29	UC3-73 (MDR)	ATM	76,F	HB/Ort	Escherichia coli	10	15	26	14(sy)	25(sy)	20(sy)	20(sy)	22	28	6	24	24	25	na	na	6	6	24	6	>30	13		
18	UC3-70 (LDM)	CTX	76,M	HB/Med Int	Escherichia coli	9	23	23	15(sy)	26	13sy	14sy	24	28	6	8	24	na	20	6	6	6	na	24	19	6		
9	UC3-83 (LDM)	CAZ	76,M	Dc	Escherichia coli	6	11	16	12	15	12	18	22	36	9	25	24	na	na	6	10	6	24	6	na	6	Δ CTX/CTX+ CLAV 19	
34	UC3-44 (LDM)	CAZ	80,F	HB, Ort	Klebsiella pneumoniae	9	7	14	17	14	8	27	6	27	na	24	16	26	22	24	6	6	24	6	7	6	Δ ATM/ATM+ CLAV 8	
	UC3-34	MRP			Klebsiella pneumoniae	6	7	17	13	16	15	27	7	11	14	25	13	na	na	6	6	17	18	10	na	6		

Legenda: MS* - meio de seleção de MacConkey agar com antibiótico β -lactâmico: CAZ - ceftazidima (2 μ g/ml), CTX - cefotaxima (2 μ g/ml), ATM - aztreonamo (2 μ g/ml); I/S♦ - idade/sexo; ** antibióticos β -lactâmicos: AML - ampicilina, AMC - amoxicilina com ácido clavulânico, TZP - piperacilina/tazobactam, CTX - cefotaxima, CAZ - ceftazidima, FEP - cefepime, ATM - aztreonamo, FOX - cefoxitina, IMP - imipenemo; *** antibióticos não β -lactâmicos: S - estreptomicina, CN - gentamicina, TOB - tobramicina, AK - amikacina, NET - netilmicina, NA - ácido nalidixico, CIP - ciprofloxacina, TE - tetraciclina, TGC - tigeciclina, C - cloranfenicol, F - nitrofurantoína; T/S - trimetoprim/sulfametoxazol; sy - sinergismo entre o oximino- β -lactâmico e amoxicilina com ácido clavulânico; >30mm - halo de inibição superior a 30mm; **** - deteção da produção de ESBLs, pelo método de adição de ácido clavulânico ao disco de oximino- β -lactâmico com maior redução de suscetibilidade: $\Delta_{CTX/CLAV}$ - diferença entre o halo de inibição de cefotaxima e o halo de inibição de cefotaxima com ácido clavulânico, $\Delta_{ATM/CLAV}$ - diferença entre o halo de inibição de aztreonamo e o halo de inibição de aztreonamo com ácido clavulânico; MDR - Média Duração e Reabilitação, LDM - Longa Duração e Manutenção, CP - Cuidados Paliativos; Origem* - HospA/Orp - referenciado pelo Hospital A (distrito de Braga), serviço de Ortopedia; HB/Med Int - referenciado do Hospital de Braga, serviço de medicina interna; HospB/Orp - referenciado pelo Hospital B (distrito de Braga), serviço de Ortopedia; HB/Ort + UCCI** - doente internado por longo período no hospital de Braga, referenciado para a UCCI contemplada no estudo de colonização fecal (UCCI 2); HB/Onc - Hospital de Braga - serviço de oncologia; HB/Neur - hospital de Braga - neurologia; Hosp C, D, E - transferência inter-hospitalar, por curto período (hospital C - distrito de Braga, hospital D e E - distrito do Porto); Dc - utente residente no domicílio, referenciado para a UCCI pela Unidade de Saúde Familiar da área de residência (distrito de Braga). Avaliação qualitativa da resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos segundo directrizes do CLSI (2013): Isolado resistente; Isolado com sensibilidade intermédia; Isolado sensível; na - antibiótico não avaliado no teste de suscetibilidade aos antibióticos.

Tabela 11 (continuação) - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β-lactâmicos e não β-lactâmicos de isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* provenientes do estudo de colonização fecal na UCCI 3

Amostra	Isolado (Data)	MS	I/S	Origem	Identificação	Suscetibilidade aos antibióticos β-lactâmicos (halo em mm)**										Suscetibilidade aos antibióticos β-lactâmicos (halo em mm)***										Pesquisa de ESBLs****	
						AML	AMC	TZP	CTX	CAZ	ATM	FEP	FOX	IPM	S	CN	TOB	AK	NET	NA	CIP	TE	TGC	C	F		T/S
4	UC3-88 (LDM)	CAZ	77,F	HB/Med Int + UCCI	Escherichia coli	6	9	13	9	18	9	15	19	30	8	25	25	na	na	na	6	7	24	6	na	6	Δ CTX/CTX+CLAV 17
31	UC3-89 (LDM)	ATM	65,F	Hosp C, D, E	Escherichia coli	11	20	na	10(sy)	16(sy)	22(sy)	17(sy)	22	28	6	10	7	23	na	6	6	17	na	30	26	7	
	UC3-31	MRP			Klebsiella pneumoniae	7	6	22	30	26	≥30	32	22	17	14	27	23	na	na	6	10	6	15	26	na	16	
32	UC3-49 (LDM)	CTX	86,F	Dc	Escherichia coli	15	10	na	9(sy)	16(sy)	13(sy)	16(sy)	20	34	6	10	7	23	na	6	6	17	24	30	26	7	
37	UC3-55 (LDM)	ATM	71,F	HB/Neur	Escherichia coli	13	13	23	10(sy)	16(sy)	15(sy)	16(sy)	24	26	7	11	9	23	na	6	7	7	23	25	26	6	
24	UC3-24	MRP	82,F	HB, Med Int	Klebsiella pneumoniae	7	6	na	15	15	20	23	6	6	16	27	17	na	na	6	6	6	13	6	na	6	
36	UC3-75 (CP)	CTX	80,F	Dc	Escherichia coli	16	16	20	20(sy)	26(sy)	22(sy)	32	30	32	7	20	10	na	19	6	6	20	21	6	22	na	

Legenda: MS* - meio de seleção de MacConkey agar com antibiótico β-lactâmico: CAZ - ceftazidima (2μg/ml), CTX - cefotaxima (2μg/ml), ATM - aztreonamo (2μg/ml); I/S♦ - idade/sexo; ** antibióticos β-lactâmicos: AML - ampicilina, AMC - amoxicilina com ácido clavulânico, TZP - piperacilina/tazobactam, CTX - cefotaxima, CAZ - ceftazidima, FEP - cefepime, ATM - aztreonamo, FOX - cefoxitina, IMP - imipenemo; *** antibióticos não β-lactâmicos: S - estreptomicina, CN - gentamicina, TOB - tobramicina, AK - amikacina, NET - netilmicina, NA - ácido nalidixico, CIP - ciprofloxacina, TE - tetraciclina, TGC - tigeciclina, C - cloranfenicol, F - nitrofurantoína; T/S - trimetoprim/sulfametoxazol; sy - sinergismo entre o oximino-β-lactâmico e amoxicilina com ácido clavulânico; >30mm - halo de inibição superior a 30mm; **** - detecção da produção de ESBLs, pelo método de adição de ácido clavulânico ao disco de oximino-β-lactâmico com maior redução de suscetibilidade: Δ^{CTX/CLAV} - diferença entre o halo de inibição de cefotaxima e o halo de inibição de cefotaxima com ácido clavulânico, Δ^{ATM/CLAV} - diferença entre o halo de inibição de aztreonamo e o halo de inibição de aztreonamo com ácido clavulânico; MDR - Média Duração e Reabilitação, LDM - Longa Duração e Manutenção, CP - Cuidados Paliativos; Origem* - HospA/Orp - referenciado pelo Hospital A (distrito de Braga), serviço de Ortopedia; HB/Med Int - referenciado do Hospital de Braga, serviço de medicina interna; HospB/Orp - referenciado pelo Hospital B (distrito de Braga), serviço de Ortopedia; HB/Ort + UCCI** - doente internado por longo período no hospital de Braga, referenciado para a UCCI contemplada no estudo de colonização fecal (UCCI 2); HB/Onc - Hospital de Braga - serviço de oncologia; HB/Neur - hospital de Braga - neurologia; Hosp C, D, E - transferência inter-hospitalar, por curto período (hospital C - distrito de Braga, hospital D e E - distrito do Porto); Dc - utente residente no domicílio, referenciado para a UCCI pela Unidade de Saúde Familiar da área de residência (distrito de Braga). Avaliação qualitativa da resistência aos antibióticos β-lactâmicos e não β-lactâmicos segundo directrizes do CLSI (2013): Isolado resistente; Isolado com sensibilidade intermédia; Isolado sensível; na - antibiótico não avaliado no teste de suscetibilidade aos antibióticos.

2.3 – Caracterização fenotípica da resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos dos isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs responsáveis por infeções do hospital de Braga

A CMI dos antibióticos β -lactâmicos e avaliação qualitativa da resistência aos antibióticos não β -lactâmicos testados nos equipamentos automatizados Vitek e/ou Walkaway do laboratório de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica do hospital de Braga são apresentados para os sessenta isolados de *Escherichia coli* produtora de ESBL (Tabela 12) e vinte e nove isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL (Tabela 13).

A deteção de produção de ESBLs foi determinada nos equipamentos ViteK e/ou WalkWay disponíveis no Laboratório de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Braga. A deteção e/ou confirmação da produção de ESBLs foi realizada em alguns isolados pela determinação da CMI através de tiras E-test CT/CTL, TZ/TZL e PM/PML no Laboratório de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica. Os isolados foram estudados como produtores de ESBLs segundo indicação do referido laboratório.

Tabela 12 - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos dos isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs responsáveis por infeções do Hospital de Braga

Isolado	Idade /Sexo	Informação Clínica	Origem	Serviço	Produto Biológico	Concentração Mínima Inibitória (mg/l)															Resultados do estudo de suscetibilidade aos antibióticos não β-lactâmicos
						AM	PI	P/T	TI	AMX	CFZ	CF	CFT	CAZ	CAZ/CA	FEP	CRM	CFX	ETP	IMP	
HB4 (Fev, 09)	72/F	IR, Pneumonia	Dc (ac)	Urgência	Expectoração	>16	>64	≤16	>64	>16/8	>16	>16	>32	>16	≤0,5	>16	>16	≤8		≤2	CN, TOB, AK, NA, NOR, CIP, LVX, T/S, FOS, F
HB5 (Fev, 09)					Urina	>16	>64	≤16	>64	>16/8	>16	>16	>32	>16	≤0,5	>16	>16	≤8		≤2	CN, TOB, AK, NA, NOR, CIP, LVX, T/S, FOS, F
HB6 (Fev, 09)	65/F	Lúpus, Litíase renal	Lar de idosos*	Consulta urologia	Urina	>16	>64	≤16	>64	≤8/4	>16	>16	>32	≤1	≤0,5	8	>16	≤8		≤2	CN, TOB, AK, NA, NOR, CIP, LVX, T/S, FOS, F
HB8 (Fev, 09)	46/F	ITU	Dc	Urologia	Pús perineal	>16	>64	≤16	>64	≤8/4	>16	>16	>32	4	≤0,5	>16	>16	>16		≤2	CN, TOB, AK, NA, NOR, CIP, LVX, T/S, FOS, F
HB9 (Fev, 09)	55/M	TVM, Citostomia	Dc	MFR	Urina	>16	>64	>64	>64	>16/8	>16	>16	>32	>16	≤0,5	>16	>16	16		≤2	CN, TOB, AK, NA, NOR, CIP, LVX, T/S, FOS, F
HB18 (Fev, 09)	85/M	IRC, ITU	Dc	Urgência	Urina	≥32		≤4		16		≥64	≥64	≤1		2	≥64			≤0,25	CN, TOB, AK, CIP, LVX, TE, T/S, FOS, F
HB21 (Fev, 09)	79/M	IRC, ITU	Dc	Medicina interna	Hemo	≥32		8		≥32		≥64	≥64	≤1		≤1	≥64			≤0,25	CN, TOB, AK, NOR, CIP, LVX, TE, T/S, F
HB22 (Fev, 09)	78/F	IRC, ITU, Tetraplegia	Dc (ac)	Consulta MFR	Urina	>16	>64	≤16	>64	>16/8	>16	>16	>32	>16	≤0,5	>16	>16	≤8		≤2	CN, TOB, AK, NA, NOR, CIP, LVX, T/S, FOS, F
HB25 (Fev, 09)	58/F	IRC, ITU, IC	Dc	Medicina interna	Urina	>16	>64	≤16	>64	≤8/4	>16	>16	32	≤1	≤0,5	8	>16	≤8		≤2	CN, TOB, AK, NA, NOR, CIP, LVX, T/S, FOS, F
HB26 (Fev, 09)	57/M	ITU, Linfoma não Hodgkin	Dc	Consulta urologia	Urina	≥32		≤4		16		≥64	≤1	16		≤1	16			≤0,25	CN, TOB, AK, NOR, CIP, LVX, TE, T/S, F
HB27 (Fev, 09)	53/M	TVM	Dc	MFR	Urina	≥32		8		16		≥64	≥64	16		8	≥64			≤0,25	CN, TOB, AK, NOR, CIP, LVX, TE T/S, F
HB28 (Fev, 09)	81/F	HTA	Dc (ac)**	Consulta medicina interna	Urina	≥32		≤4		8		≥64	≥64	4		2	≥64			≤0,25	CN, TOB, AK, NOR, CIP, LVX, TE T/S, F
HB32 (Mar, 09)	55/M	Tetraplegia	Dc	MFR	Urina	>16	>64	64	>64	>16/8	>16	>16	>32	>16	≤0,5	>16	>16	≤8		≤2	CN, TOB, AK, NA, NOR, CIP, LVX, T/S, FOS, F

Legenda: HB - Hospital de Braga; F - Feminino, M - Masculino; Zaragatoa cutânea da sacro; Liq per - Líquido Peritoneal; Fev, 09 - Fevereiro de 2009; Mar, 09 - Março de 2009; Abr, 09 - Abril de 2009; Fev, 12 - Fevereiro de 2012, Mar, 12 - Março de 2012; * - lar de idosos do distrito de Braga, não contemplado no estudo de colonização fecal; ** - doente acamado no domicílio com apoio na prestação de cuidados pela Unidade de Saúde Familiar da área de residência (distrito de Braga); Dc (CP) - utente no domicílio com apoio da equipa de cuidados paliativos da USF da área de residência (distrito de Braga); IR - insuficiência respiratória; IC - insuficiência cardíaca; ICC - insuficiência cardíaca congestiva; IRC - insuficiência renal crónica; TVM - Traumatismo vertebro-medular; HTA - hipertensão arterial; DPCO - Doença Pulmonar Crónica Obstrutiva; AM - ampicilina, PI - Piperacilina, P/T - piperacilina/tazobactam; TI - ticarcilina, AMX - amoxicilina e ácido clavulânico, CFZ - cefazolina, CF - cefalotina, CFT - Cefotaxima, CAZ - ceftazidima, CAZ/CA - ceftazidima com ácido clavulânico; FEP - cefepime, CRM - cefuroxima, CFX - cefoxitina, ETP - ertapenemo; IMP - imipenemo; MER - meropenemo; CN - gentamicina, TOB - tobramicina, AK - amicacina, NA - ácido nalidíxico, NOR - norfloxacin, CIP - ciprofloxacina, LVX - levofloxacina, T/S - Trimetoprim/Sulfametoxazol, FOS - fosfomicina, F - nitrofurantoína, C - cloranfenicol; **Isolado resistente**; **Isolado com sensibilidade intermédia**; **Isolado sensível**; na - antibiótico não avaliado no teste de suscetibilidade aos antibióticos

Tabela 12 (Continuação) - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos dos isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs responsáveis por infeções do Hospital de Braga

Isolado	Idade/ Sexo	Informação Clínica	Origem	Serviço	Produto Biológico	Concentração Mínima Inibitória (mg/l)															Resultados do estudo de suscetibilidade aos antibióticos não β- lactâmicos	
						AM	PI	P/T	TI	AUG	CFZ	CF	CFT	CAZ	CAZ /CA	CPE	CRM	CFX	ETP	IMP		
HB42 (Mar,09)	19/F	Apendicite	Dc	Cirurgia	Líquido perineal	>16	>64	≤16	>64	≤8/4	>16	>16	>32	4	≤0,5	>16	>16	≤8		≤2	CN, TOB, NOR, AK, NA, CIP, LVX, T/S, FOS, F	
HB52 (Mar,09)	78/F	IRC	Dc	Urgência	Hemocultura	≥32		8		≥32		≥64	≥64	≥64		≥64	≥64			≤0,25	CN, TOB, AK, NOR, CIP, LVX, TE T/S, F	
HB53 (Mar,09)	38/M	Tetraplegia	Dc	Consulta MFR	Urina	≥32		64		≥32		≥64	≥64	≥64		32	≥64			≤0,25	CN, TOB, AK, NOR, CIP, LVX, TE T/S, F	
HB55 (Mar,09)	57/M	Tetraplegia	Dc	MFR	Urina	>16	>64	≤16	>64	16/8	>16	>16	>32	>16	≤0,5	>16	>16	≤8		≤2	CN, TOB, AK, NA, NOR, CIP, LVX, T/S, FOS, F	
HB63 (Abr,09)	70/M	IRC	Dc	Urologia	Urina	>16	>64	>64	>64	>16/8	>16 R	>16	>32	>16	≤0,5	>16	>16	>16		≤2	CN, TOB, AK, NA, NOR, CIP, LVX, T/S, FOS, F	
HB65 (Abr,09)	66/F	IRC	Dc	Urgência	Urina	≥32		64		≥32		≥64	≥64	≥64		16	≥64			≤0,25	CN, TOB, AK, NOR, CIP, LVX, TE T/S, F	
HB66 (Abr,09)	78/M	IRC, tumor vesical	Dc	Urologia	Urina	≥32		8		16		≥64	≥64	16		8	≥64			≤0,25	CN, TOB, AK, NOR, CIP, LVX, TE, T/S, F	
HB67 (Abr,09)	77/F	ITU	Dc	Urologia	Urina	≥32		64		≥32		≥64	2	8		≤1	≥64			≤0,25	CN, TOB, AK, NOR, CIP, LVX, TE, T/S, F	
HB68 (Mar,09)	55/M	DPCO, ITU	Dc	Urgência	Urina	≥32		≤4		8		≥64	≥64	16		8	≥64			≤0,25	CN, TOB, AK, NOR, CIP, LVX, TE, T/S, F	
HB69 (Mar,09)	42/M	TVM	Dc	MFR	Urina	≥32		≤4		8		≥64	≥64	16		81	≥64			≤0,25	CN, TOB, AK, NOR, CIP, LVX, TE, T/S, F	
HB79 (Mar,09)	64/F	Queimadura 3º grau membros superiores	Dc	Cirurgia plástica	Urina	>16	>64	≤16	>64	>16/8	>16	>16	>32	>16	≤0,5	>16	>16	≤8		≤2	CN, TOB, AK, NA, NOR, CIP, LVX, T/S, FOS, F	

Legenda: HB - Hospital de Braga; F - Feminino, M - Masculino; Zaragatoa cutânea da sacro; Líq per - Líquido Peritoneal; Fev, 09 - Fevereiro de 2009; Mar, 09 - Março de 2009; Abr, 09 - Abril de 2009; Fev, 12 - Fevereiro de 2012, Mar, 12 - Março de 2012; *- lar de idosos do distrito de Braga, não contemplado no estudo de colonização fecal; ** - doente acamado no domicílio com apoio na prestação de cuidados pela Unidade de Saúde Familiar da área de residência (distrito de Braga); Dc (CP) - utente no domicílio com apoio da equipa de cuidados paliativos da USF da área de residência (distrito de Braga); IR - insuficiência respiratória; IC - insuficiência cardíaca; ICC - insuficiência cardíaca congestiva; IRC - insuficiência renal crónica; DPCO - Doença Pulmonar Crónica Obstrutiva; TVM - Traumatismo vertebro-medular; HTA - hipertensão arterial; AM - ampicilina, PI - Piperacilina, P/T - piperacilina/tazobactam; TI - ticarcilina, AMX - amoxicilina e ácido clavulânico, CFZ - cefazolina, CF - cefalotina, CFT - Cefotaxima, CAZ - ceftazidima, CAZ/CA - ceftazidima com ácido clavulânico; FEP - cefepime, CRM - cefuroxima, CFX - cefoxitina, ETP - ertapenemo; IMP - imipenemo; MER - meropenemo; CN - gentamicina, TOB - tobramicina, AK - amikacina, NA - ácido nalidixico, NOR - norfloxacina, CIP - ciprofloxacina, LVX - levofloxacina, T/S - Trimetoprim/Sulfametoxazol, FOS - fosfomicina, F - nitrofurantoína, C - cloranfenicol; Isolado resistente; Isolado com sensibilidade intermédia; Isolado sensível; na - antibiótico não avaliado no teste de suscetibilidade aos antibióticos

Tabela 12 (Continuação) - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos dos isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs responsáveis por infecções do Hospital de Braga

Isolado	Idade/ Sexo	Informação Clínica	Origem	Serviço	Produto Biológico	Concentração Mínima Inibitória (mg/l)															Resultados do estudo de suscetibilidade aos antibióticos não β-lactâmicos
						AM	PI	P/T	TI	AUG	CFZ	CF	CFT	CAZ	CAZ /CA	CPE	CRM	CFX	ETP	IMP	
HB80 (Abr,09)	67/F	Síndrome Guillain Barre	Ds (ac)	Neurologia	Urina	>16	>64	≤16	>64	≤8/4	>16	>16	>32	≤1	≤0,5	>16	>16	≤8		≤2	CN, TOB, AK, NA, NOR, CIP, LVX, T/S, FOS, F
HB90 (Abr,09)	47/M	Sepsis	Dc	UCIP	Urina	>16	>64	≤16	>64	>16/8	>16	>16	>32	>16	≤0,5	>16	>16	16		≤2	CN, TOB, AK, NA, NOR, CIP, LVX, T/S, FOS, F
HB93 (Mai, 09)	63/F	ITU	Dc	Medicina interna	Urina	>16	>64	≤16	>64	16/8	>16	>16	>32	>16	≤0,5	>16	>16	≤8		≤2	CN, TO, AK, NA, NOR, CIP, LVX, T/S, FOS, F
HB 71 (Mai, 09)	47/M	Sepsis	Dc	UCIP	Urina	>16	>64	≤16	>64	16/8	>16	>16	>32	>16	≤0,5	>16	>16	≤8		≤2	CN, TOB, AK, NOR, CIP, LVX, TE, T/S, F
HB106 (Mai, 09)	83/F	AVC	Dc (ac)**	Medicina interna	Hemocultura	>16	>64	≤16	>64	16/8	>16	>16	>32	>16	≤0,5	>16	>16	≤8		≤2	CN, TOB, AK, NOR, CIP, LVX, TE, T/S, F
HB111 (Mai, 09)	47/M	Sepsis	Dc	UCIP	Urina	≥32		8		≥32		≥64	≥64	16 I		8	≥64			≤0,25	CN, TOB, AK, NOR, CIP, LVX, TE, F, T/S
HB117 (Jun, 09)	43/M	Tetraplegia	Dc	MFR	Urina	>16	>64	≤16	>64	16/8	>16	>16	>32	>16	≤0,5	>16	>16	≤8		≤2	CN, TOB, AK, NOR, CIP, LVX, TE, T/S, F
HB119 (Jun, 09)	55/M	TVM	Dc	MFR	Urina	>16	>64	>64	>64	>16/8	>16	>16	>32	>16	≤0,5	>16	>16	16		≤2	CN, TOB, AK, NOR, CIP, LVX, T/S,FOS, F
HB122 (Jun, 09)	77/F	IRC, ICC, ITU	Dc	Medicina interna	Urina	>16	>64	≤16	>64	16/8	>16	>16	>32	>16	≤0,5	>16	>16	16		≤2	CN, TOB, AK, NA, NOR, CIP, LVX, T/S, FOS, F
HB130 (Jul, 09)	74/M	Neoplasia do cólon recidiva	Dc	Consulta nefrologia	Urina	>16	>64	≤16	>64	16/8	>16	>16	>32	4S	≤0,5	>16	>16	≤8		≤2	CN, TOB, AK, NA, NOR, CIP, LVX, T/S, FOS, F
HB131 (Jun, 09)	78/M	IRC, tumor vesical	Dc	Consulta urologia	Urina	≥32		8		16		≥64	≥64	16		8	≥64			≤0,25	CN, TOB, AK, NOR, CIP, LVX, TE, T/S, F
HB132 (Jun, 09)	71/F	Diabetes mellitus tipo II, anemia	Dc	Urgência	Urina	>16	>64	≤16	>64	≤8/4	>16	>16	>32	4	≤0,5	16	>16	≤8		≤2	CN, TOB, AK, NOR, NA CIP, LVX, T/S, FOS, F
HB133 (Jun, 09)	63/M	Carcinoma da prostata	Dc	Hospital de Dia	Urina	≥32		≤4		≤2		≥64	≤1	4		≤11	4R			≤0,25	CN, TOB, AK, NOR, CIP, LVX TE, T/S, F

Legenda: HB - Hospital de Braga; F- Feminino, M - Masculino; Zaragatoa cutânea da sacro; Líq per - Líquido Peritoneal; Fev, 09 - Fevereiro de 2009; Mar, 09 - Março de 2009; Abr, 09 - Abril de 2009; Fev, 12 - Fevereiro de 2012; Mar, 12 - Março de 2012; *- lar de idosos do distrito de Braga, não contemplado no estudo de colonização fecal; ** - doente acamado no domicílio com apoio na prestação de cuidados pela Unidade de Saúde Familiar da área de residência (distrito de Braga); Dc (CP) - utente no domicílio com apoio da equipa de cuidados paliativos da USF da área de residência (distrito de Braga); IR - insuficiência respiratória; IC - insuficiência cardíaca; ICC - insuficiência cardíaca congestiva; IRC - insuficiência renal crónica; TVM - Traumatismo vertebro-medular; HTA - hipertensão arterial; DPCO - Doença Pulmonar Crónica Obstrutiva; AM - ampicilina, PI - Piperacilina, P/T - piperacilina/tazobactam; TI - ticarcilina, AMX - amoxicilina e ácido clavulânico, CFZ - cefazolina, CF - cefalotina, CFT - Cefotaxima, CAZ - ceftazidima, CAZ/CA - ceftazidima com ácido clavulânico; FEP - cefepime, CRM - cefuroxima, CFX - cefoxitina, ETP - ertapenemo; IMP - imipenemo; MER - meropenemo; CN - gentamicina, TOB - tobramicina, AK - amicacina, NA - ácido nalidíxico, NOR - norfloxacin, CIP - ciprofloxacina, LVX - levofloxacina, T/S - Trimetoprim/Sulfametoxazol, FOS - fosfomicina, F - nitrofurantoína, C - cloranfenicol; Isolado resistente; Isolado com sensibilidade intermédia; Isolado sensível; na - antibiótico não avaliado no teste de suscetibilidade aos antibióticos

Tabela 12 (Continuação) - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos dos isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs responsáveis por infeções do Hospital de Braga

Isolado	Idade/ Sexo	Informação Clínica	Origem	Serviço	Produto Biológico	Concentração Mínima Inibitória (mg/l)															Resultados do estudo de suscetibilidade aos antibióticos não β- lactâmicos		
						AM	PI	P/T	TI	AUG	CFZ	CF	CFT	CAZ	CAZ/ CA	CPE	CRM	CFX	ETP	IMP	MER		
HB144 (Jun, 09)	68/M	Tetraplegia	Dc	MFR	Urina	>16	>64	≤16	>64	16/8	>16	>16	>32	>16	≤0,5	>16	>16	≤8		≤2		CN, TOB, AK, NOR, CIP, LVX, TE, T/S, F	
HB163 (Jun, 09)	72/F	Diabética, pancreatite aguda	Dc	Cirurgia geral	Hemocultura	≥32		≥12 8		≥32		≥64	≥64	≥64			≥64R		≤0,5		≤0,25	CN, TOB, AK, CIP, LVX, T/S, F	
HB166 (Fev, 12)	66/M	IRC	Dc	Urologia	Urina	>16		≤8		16/8	>16	>16	>32	>16	≤0,2 5	>16	>16	≤8	≤1	≤1		CN, TOB, NA, NOR, CIP, FOS, T/S, F	
HB169 (Jan, 12)	70/M	IRC	Dc	Consulta urologia	Urina	>16		≤8		16/8	>16	>16	>32	>16	≤0,2 5	>16	>16	≤8	≤1	≤1		CN, TOB, NA, CIP, NOR, T/S, F, FOS	
H170 (Jan, 12)	25/M	TVM	Dc	Consulta urologia	Urina	>16		16		16/8	>16	>16	>32	>16	≤0,2 5	>16	>16	>16	≤1	≤1		CN, TOB, NA, NOR, CIP, FOS, T/S, F	
HB171 (Mar, 12)	38/M	Pielonefrite	Dc	Urgência	Urina	>16		≤8		≤8/4	>16	>16	>32	8	≤0,2 5	>16	>16	≤8	≤1	≤1		CN, TOB, NA, NOR, CIP, FOS, T/S, F	
HB176 (Mar, 12)	76/M	IC, IR	Dc	Medicina interna	Expectoração	>16		≤8		16/8	>16	>16	>32	>16	≤0,2 5	>16	>16	≤8	≤1	≤1		CN, TOB NA, NOR CIP, FOS, T/S, F	
HB180 (Mar, 12)	57/F	Diabetes mellitus, ITU	Dc	Urgência	Urina	>16		≤8		>16/ 8	>16	>16	4	16	2	≤1	16	>16	≤1	≤1		CN, CIP, F, FOS, NA, NOR, T/S, TOB	
HB184 (Mar, 12)	79/F	Cardiopatia, IRC, ITU	Dc	Medicina interna	Urina	>16		≤8		≤8/4	>16	>16	>32	16	≤0,2 5	>16	16	≤8	≤1	≤1		CN, TOB, NA, NOR, CIP, T/S, FOS, F	
HB186 (Fev, 12)	38/M	Doença hepática crônica	Dc	Urgência	Hemocultura	≥32		≤4		4		≥64	≤1	8			8		≤0,5		≤0,25	CN, TOB, AK, CIP, LVX, T/S, F	
HB187 (Fev, 12)	61/F	Carcinoma da mama	Dc	Oncologia	Urina	≤8		≤8		≤8/4	≤8	≤8	≤1	2	≤0,2 5	≤1	≤4	≤8	≤1	≤1		CN, TOB, NA, NOR, CIP, FOS, T/S, F	
HB189 (Jan, 12)	89/F	IR, ITU	Lar de idosos*	Medicina interna	Urina	>16 R		16S		16/8I	>16 R	>16 R	>32	>16	≤0,2 5	>16 R	>16R	>16R	≤1	≤1S		CN, TOB, NA, NOR, CIP, FOS, T/S, F	
HB190 (Fev, 12)	79/F	Neoplasia gástrica	Dc	Oncologia	Urina	>16		≤8		16/8	>16	>16	>32	>16	≤0,2 5	>16	>16	≤8	≤1	≤1		CN, TOB, NA, NOR, CIP, FOS, T/S, F	

Legenda: HB - Hospital de Braga; F- Feminino, M - Masculino; Zaragatoa cutânea da sacro; Líq per - Líquido Peritoneal; Fev, 09 - Fevereiro de 2009; Mar, 09 - Março de 2009; Abr, 09 - Abril de 2009; Fev, 12 - Fevereiro de 2012, Mar, 12 - Março de 2012; * - lar de idosos do distrito de Braga, não contemplado no estudo de colonização fecal; ** - doente acamado no domicílio com apoio na prestação de cuidados pela Unidade de Saúde Familiar da área de residência (distrito de Braga); Dc (CP) - utente no domicílio com apoio da equipa de cuidados paliativos da USF da área de residência (distrito de Braga); IR - insuficiência respiratória; IC - insuficiência cardíaca; ICC - insuficiência cardíaca congestiva; IRC - insuficiência renal crónica; TVM - Traumatismo vertebro-medular; HTA - hipertensão arterial; DPCO - Doença Pulmonar Crónica Obstrutiva; AM - ampicilina, PI - Piperacilina, P/T - piperacilina/tazobactam; TI - ticarcilina, AMX - amoxicilina e ácido clavulânico, CFZ - cefazolina, CF - cefalotina, CFT - Cefotaxima, CAZ - ceftazidima, CAZ/CA - ceftazidima com ácido clavulânico; FEP - cefepime, CRM - cefuroxima, CFX - cefoxitina, ETP - ertapenemo; IMP - imipenemo; MER - meropenemo; CN - gentamicina, TOB - tobramicina, AK - amicacina, NA - ácido nalidíxico, NOR - norfloxacin, CIP - ciprofloxacina, LVX - levofloxacina, T/S - Trimetoprim/Sulfametoxazol, FOS - fosfomicina, F - nitrofurantoína, C - cloranfenicol; Isolado resistente; Isolado com sensibilidade intermédia; Isolado sensível; na - antibiótico não avaliado no teste de suscetibilidade aos antibióticos.

Tabela 12 (Continuação) - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos dos isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs responsáveis por infeções do Hospital de Braga

Isolado	Idade/ Sexo	Informação Clínica	Origem	Serviço	Produto Biológico	Concentração Mínima Inibitória (mg/l)															Resultados do estudo de suscetibilidade aos antibióticos não β- lactâmicos		
						AM	PI	P/T	TI	AUG	CFZ	CF	CFT	CAZ	CAZ/ CA	CPE	CRM	CFX	ETP	IMP			
HB192 (Fev, 12)	78/M	Rectorragias, hemorragia digestiva baixa	Lar de idosos*	Cirurgia geral	Urina	>16		16		16/8	>16	>16	>32	>16	≤0,2 5	>16	>16	≤8	≤1	≤1		CN, TOB, NA, NOR, CIP, FOS, T/S, F	
HB193 (Fev, 12)	81/F	IR, Pneumonia associada à comunidade	Dc	Medicina interna	Urina	>16		>64		>16/8	>16	>16	>32	>16	2	>16	>16	≤8	≤1	≤1		CN, TOB, NA, NOR, CIP, FOS, T/S, F	
HB194 (Mar, 12)	39/F	ITU, abscesso intra- abdominal	Dc	Cirurgia geral	Urina	≥32		≤4		4		16	≤1	≤1			16		≤0,5		≤0,25	CN, TOB, AK, CIP, LVX, T/S, F	
HB195 (Fev, 12)	94/M	Pneumonia, ITU	Dc	Ortopedia	Urina	>16		16		>16/8	>16	>16	>32	>16	0,5	>16	>16	≤8	≤1	≤1		CN, TOB, NA, NOR, CIP, FOS, T/S, F	
HB196 (Jan, 12)	72/M	HBP, ITU	Dc	Urologia	Urina	>16		16		16/8	>16	>16	>32	>16	≤0,2 5	>16	>16	≤8	≤1	≤1		CN, TOB, NA, NOR, CIP, FOS, T/S, F	
HB197 (Mar, 12)	85/M	Diabetes mellitus	Dc (ac)(CP)* ***	Urgência	Urina	>16		≤8		16/8	>16	>16	>32	>16	≤0,2 5	>16	>16	≤8	≤1	≤1		CN, TOB, NA, NOR, CIP, T/S, FOS, F	
HB199 (Fev, 12)	24/M	Bexiga neurogénica	Dc	Consulta urologia	Urina	>16		≤8		16/8	>16	>16	>32	>16	≤0,2 5	>16	>16	≤8	≤1	≤1		CN, TOB, NA, NOR, CIP, FOS, T/S, F	
HB200 (Mar, 12)	47/F	IR, diabético	Dc	Medicina interna	Urina	>16		≤8		16/8	>16	>16	>32	≤1	≤0,2 5	8	>16	≤8	≤1	≤1		CN, TOB, NA, NOR, CIP, FOS, T/S, F	
HB201 (Fev, 12)	72/F	Abscesso abdominal	Dc	Cirurgia geral	Pús	>16		≤8		16/8	>16	>16	>32	>16	≤0,2 5	>16	>16	≤8	≤1	≤1		CN, TOB, NA, NOR, CIP, FOS, T/S, F	
HB204 (Mar, 12)	86/F	Pneumonia associada à comunidade	Lar de idosos*	Urgência	Expectoração	>16		≤8		16/8	>16	>16	>32	>16	≤0,2 5	>16	>16	≤8	≤1	≤1		CN, TOB, NA, NOR, CIP, FOS, T/S, F	

Legenda: HB - Hospital de Braga; F - Feminino, M - Masculino; Zaragatoa cutânea da sacro; Líq per - Líquido Peritoneal; Fev, 09 - Fevereiro de 2009; Mar, 09 - Março de 2009; Abr, 09 - Abril de 2009; Fev, 12 - Fevereiro de 2012; Mar, 12 - Março de 2012; * - lar de idosos do distrito de Braga, não contemplado no estudo de colonização fecal; ** - doente acamado no domicílio com apoio na prestação de cuidados pela Unidade de Saúde Familiar da área de residência (distrito de Braga); Dc (CP) - utente no domicílio com apoio da equipa de cuidados paliativos da USF da área de residência (distrito de Braga); IR - insuficiência respiratória; IC - insuficiência cardíaca; ICC - insuficiência cardíaca congestiva; IRC - insuficiência renal crónica; TVM - Traumatismo vertebro-medular; HTA - hipertensão arterial; DPCO - Doença Pulmonar Crónica Obstrutiva; AM - ampicilina, PI - Piperacilina, P/T - piperacilina/tazobactam; TI - ticarcilina, AMX - amoxicilina e ácido clavulânico, CFZ - cefazolina, CF - cefalotina, CFT - Cefotaxima, CAZ - ceftazidima, CAZ/CA - ceftazidima com ácido clavulânico; FEP - cefepime, CRM - cefuroxima, CFX - cefoxitina, ETP - ertapenemo; IMP - imipenemo; MER - meropenemo; CN - gentamicina, TOB - tobramicina, AK - amicacina, NA - ácido nalidíxico, NOR - norfloxacin, CIP - ciprofloxacina, LVX - levofloxacina, T/S - Trimetoprim/Sulfametoxazol, FOS - fosfomicina, F - nitrofurantoína, C - cloranfenicol; Isolado resistente; Isolado com sensibilidade intermédia; Isolado sensível; na - antibiótico não avaliado no teste de suscetibilidade aos antibióticos.

Tabela 13 - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs responsáveis por infeções do Hospital de Braga

Isolado (Data)	Idade/ Sexo	Origem	Serviço	Informação Clínica	Produto Biológic o	MIC (mg/l)															Suscetibilidade aos antibióticos não β- lactâmicos
						AM	AUG	PI	TI	CF	CRM	CTX	P/T	CAZ	CAZ/CAZ	CPE	CFZ	IPM	MER	ETP	
HB30 (Mar, 09)	59/F	Dc	Urgência	Tetraplegia	Zarg cutânea*	≥32	≥32	≥128		≥64	≥64	≥64	>64	≥64		16			≤0,25		CN, TOB, AK, NOR, CIP, LVX, TE, T/S, F
HB41 (Mar, 09)	72/M	Dc	MFR	Tetraplegia	Urina	>16	>16/8	>64	>64	>16	≥64	>32	>64	>16	>2	8	>16	≤2			CN, TOB, AK, NA(na), NOR, CIP, LVX, T/S, FOS, F
HB50 (Mar, 09)	58/M	Dc	Neurocirurgia	TCE	Urina	>32	>32			>64	≥64	>64	64	16		2			≤0,25		CN, TOB, AK, NOR, CIP, LVX, TE, T/S, F
HB51 (Mar, 09)	58/M	Δ	Neurocirurgia	TCE	Urina	≥32	>64			≥64	≥64	>64	32	16		2			≤0,25		CN, TO, AK, NOR, CIP, LVX, TE, T/S, F
HB71 (Mar, 09)	34/F	Dc	Urgência	ITU	Urina	>16	>16/8	>64	>64	>16	>16	>32	>64	>16	>2	>16	>16	≤2			CN, TOB, AK, NA(na), NOR, CIP, LVX, T/S, FOS, F
HB92 (Mai, 09)	43/M	Dc	MFR	TVM	Urina	>16	16/8	>64	>64	>16	>16	>32	≤16	16		≤0,5	>16	≤8	≤2		CN, TOB, AK, NOR, CIP, LVX, T/S, FOS, F
HB97 (Mai, 09)	47/M	Dc	Neurocirurgia	Endocardite , AVC	Exsudado uretral	>16	≤8/4	>64	>64	>16	>16	8	≤16	>16		≤0,5	8	>16	≤2		CN, TOB, AK, NOR, CIP, LVX, T/S, FOS, F
HB101 (Jun, 09)	76/F	Dc	MFR	IRA	Urina	>16	16/8	>64	>64	16	>16	4	>64	≤1		≤0,5	>16	16	≤2		CN, TOB, AK, NOR, CIP, LVX, T/S, FOS, F
HB102 (Abr,09)	43/M	Dc	MFR	TCE	Urina	>16	≤8/4	>64	>64	>16	>64	8	≤16	>16		1	8	>16	8		CN, TOB, AK, NA(na), NOR, CIP, LVX, T/S, FOS, F
HB104 (Abr,09)	43/M	Dc	MFR	TVM	Urina	>16	16/8	>64	>64	>16	>16	>32	≤16	>16		≤0,5	>16	≥16	≤2		CN, TOB, AK, NA(na), NOR, CIP, LVX, T/S, FOS, F
HB137 (Jun, 09)	76/ F	Dc (ac)	Urgência	IRA	Urina	>16	≤8/4	>64	>64	>16	>16	8	≤16	>16		≤0,5	8	>16	≤2		CN, TOB, AK, NOR, CIP, LVX, T/S, FOS, F
HB149 (Jun, 09)	70/M	Dc	MFR	IRC	Urina	≥32	4	>64	>64	≥64	>16	≤1	≤16	4		≤0,5	8	>16	≤2		CN, TOB, AK, NOR, CIP, LVX, T/S, FOS, F
HB162 (Mar,12)	68/M	Dc	Urgência	Pielonefrite	Urina	>16	>16/8			>16	>16	>32	>64	>16		0,5	>16	>16	≤1	≤1	CN, TOB, NA(na), NOR, CIP, T/S, FOS, F
HB164 (Jan,12)	28/M	Dc	Consulta Urologia	Sepsis	Urina	>16	16/8			>16	>16	>32	≤8	>16		≤0,25	>16	>16	≤1	≤1	CN, TOB, NA(na), NOR, CIP, T/S, FOS, F

Legenda: Δ - transferido de um hospital do distrito de Braga para o Hospital de Braga, residente no domicílio; \diamond - transferido de um hospital do distrito do Porto para o Hospital de Braga, residente de uma UCCI no distrito de Braga; TCE - Traumatismo crâneo encefálico; Dc - Domicílio; Δ -transferido do hospital de Guimarães; IRA - Insuficiência renal aguda; zaragatoa cutânea* - zaragatoa cutânea na úlcera de pressão localizada na região sagrada; Dom (CP) **** - cuidados paliativos no ambulatório; Dc - utente residente no domicílio, referenciado para a UCCI pela Unidade de Saúde Familiar da área de residência (distrito de Braga); AM - ampicilina, PI - piperacilina, P/T - piperacilina/tazobactam; TI - ticarcilina, AMX - amoxicilina e ácido clavulânico, CFZ - cefazolina, CF - cefalotina, CFT - Cefotaxima, CAZ - ceftazidima, CAZ/CA - ceftazidima com ácido clavulânico; FEP - cefepime, CRM - cefuroxima, CFX - cefoxitina, ETP - ertapenemo; IMP - imipenemo; MER - meropenemo; CN - gentamicina, TOB - tobramicina, AK - amicacina, NA - ácido nalidíxico, NOR - norfloxacin, CIP - ciprofloxacina, LVX - levofloxacina, T/S - Trimetoprim/Sulfametoxazol, FOS - fosfomicina, F - nitrofurantoína, C - cloranfenicol; Isolado resistente; Isolado com sensibilidade intermédia; Isolado sensível; na - antibiótico não avaliado no teste de suscetibilidade aos antibiótico

Tabela 13 (Continuação) - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs responsáveis por infeções do Hospital de Braga

Isolado (Data)	Idade/ Sexo	Origem	Serviço	Informação Clínica	Produto Biológico	MIC (mg/l)															Suscetibilidade antibióticos lactâmicos	aos β-
						AM	AUG	PI	TI	CF	CRM	CTX	P/T	CAZ	CAZ/ CA	CPE	CFZ	IPM	MER	ETP		
HB167 (Fev, 12)	40/M	Dc	MFR	TVM	Urina	>16	16/8			>16	>16	>32	16	>16	≤0,25	>16	>16	≤1		≤1	CN, TOB, NA(na), NOR, CIP, T/S, FOS, F	
HB168 (Mar, 12)	40/M	Dc	MFR	TVM	Urina	>16	>16/8			>16	>16	>32	16	>16	≤0,25	>16	>16	≤1		≤1	CN, TOB, NA(na), NOR, CIP, T/S, FOS, F	
HB172 (Fev, 12)	82/M	♦	Medicina Interna	IRA, Pneumonia	Expectoração	>16	>16/8			>16	≤4	≤1	>64	2	≤0,25	≤1	>16	≤1		≤1	CN, TOB, NA(na), NOR, CIP, T/S, FOS, F	
HB173 (Mar, 12)	74/M	Dc (ac)	Urgência	ITU	urina	>16	16/8			>16	≥16	>32	16	>16	0,5	>16	>16	≤1		≤1	CN, TOB, NA(na), NOR, CIP, T/S, FOS, F	
HB174 (Fev, 12)	45/M	Dc	Urgência	TVM	urina	>16	>16/8			>16	>16	>32	16	>16	0,5	>16	>16	≤1		≤1	CN, TOB, NA(na), NOR, CIP, T/S, FOS, F	
HB177 (Mar, 12)	98/F	Dc (ac)	Urgência	Insuficiência respiratória	Aspirado brônquico	≥32	16			≥64	≥64	≥64	≥128	≥64					≤0,25	≤0,5	CN, TOB, AK, CIP, LVX, T/S, F	
HB179 (Fev, 12)	81/M	Dc	Urgência	Quadro infeccioso	urina	>16	≤8/4			>16	>16	>32	≤8	>16	≤0,25	>16	>16	≤1		≤1	CN, TOB, NA(na), NOR, CIP, T/S, FOS, F	
HB182 (Fev, 12)	93/M	Dc	Ortopedia	Pneumonia noscomial	Expectoração	≥32	≥32			≥64	≥64	≥64	≥128	≥64					≤0,25	1	CN, TOB, AK, CIP, LVX, T/S, F	
HB183 (Fev, 12)	80/F	Dc	Cirurgia	Síndrome de Mirizzi	Cálculo biliar	≥32	16			≥64	≥64	32	8	≥64					≤0,25	≤0,5	CN, TOB, AK, CIP, LVX, TIG, T/S, F	
HB185 (Fev, 12)	76/F	Dc (ac)	Urgência	Pneumonia	Urina	>16	16/8			>16	>16	>32	≤8	8	≤0,25	16	>16	≤1		≤1	CN, TOB, NA(na), NOR, CIP, T/S, FOS, FD	
HB188 (Fev, 12)	85/M	Lar de idosos	Ortopedia	Nefrostomia, neoplasia da bexiga	Urina	>16	>16/8			>16	>16	>32	64	>16	0,5	>16	>16	≤1		≤1	CN, TOB, NA(na), NOR, CIP, T/S, FOS, F	
HB198 (Fev, 12)	93/M	Dc	Ortopedia	Pneumonia nosocomial	Urina	>16	16/8			>16	>16	>32	16	>16	≤0,25	>16	>16	≤1		≤1	CN, TOB, NA(na), NOR, CIP, T/S, FOS, F	
HB202 (Fev, 12)	74/M	Dc	Urgência	ITU, IRC	Urina	>16	>16/8			>16	>16	>32	64	>16	0,5	>16	>16	≤1		≤1	CN, TOB, NA(na), NOR, CIP, T/S, FOS, F	
HB203 (Fev, 12)	66/M	Dc	Medicina Interna	IRC	Urina	>16	>16/8			>16	>16	>32	16	>16	≤0,25	>16	>16	≤1		≤1	CN, TOB, NA(na), NOR, CIP, T/S, FOS, F	
HB205 (Fev, 12)	67/M	Dc	Urgência	Neoplasia vesical	Urina	>16	>16/8			>16	>16	>32	>64	>16	0,5	>16	>16	≤1		≤1	CN, TOB, NA(na), NOR, CIP, T/S, FOS, F	

Legenda: Δ - transferido de um hospital do distrito de Braga para o Hospital de Braga, residente no domicílio; ♦ - transferido de um hospital do distrito do Porto para o Hospital de Braga, residente de uma UCCI no distrito de Braga; TCE - Traumatismo crâneo encefálico; Dc - Domicílio; Δ - transferido do hospital de Guimarães; IRA - Insuficiência renal aguda; zaragatoa cutânea* - zaragatoa cutânea na úlcera de pressão localizada na região sagrada; Dom (CP) **** - cuidados paliativos no ambulatório; Dc - utente residente no domicílio, referenciado para a UCCI pela Unidade de Saúde Familiar da área de residência (distrito de Braga); AM - ampicilina, PI - Piperacilina, P/T - piperacilina/tazobactam; TI - ticarcilina, AMX - amoxicilina e ácido clavulânico, CFZ - cefazolina, CF - cefalotina, CFT - Cefotaxima, CAZ - ceftazidima, CAZ/CA - ceftazidima com ácido clavulânico; FEP - cefepime, CRM - cefuroxima, CFX - ceftoxitina, ETP - ertapenemo; IMP - imipenemo; MER - meropenemo; CN - gentamicina, TOB - tobramicina, AK - amicacina, NA - ácido nalidíxico, NOR - norfloxacin, CIP - ciprofloxacina, LVX - levofloxacina, T/S - Trimetoprim/Sulfametoxazol, FOS - fosfomicina, F - nitrofurantoína, C - cloranfenicol; **Isolado resistente**; **Isolado com sensibilidade intermédia**; **Isolado sensível**; na - antibiótico não avaliado no teste de suscetibilidade aos antibiótico

3 – Caracterização molecular dos isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs provenientes do estudo de colonização fecal e responsáveis por infeções do hospital de Braga

A caracterização molecular de genes que codificam β -lactamases e de resistência aos antibióticos não β -lactâmicos, foi realizada em isolados de *Escherichia coli* produtora de ESBL provenientes do estudo de colonização fecal e em isolados responsáveis por infeções do hospital de Braga. Nos isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBL provenientes do estudo de colonização fecal e responsáveis por infeções avaliou-se a possível associação ao grupo clonal O25b-ST131 e grupos filogenéticos por PCR. Com o objectivo de avaliar o potencial virulento dos isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBL, particularmente os de colonização fecal, foram pesquisados genes codificadores de fatores de virulência por PCR.

3.1 – Caracterização dos genes codificadores de β -lactamases em isolados de *Escherichia coli* provenientes do estudo de colonização fecal e responsáveis por infeções do hospital de Braga

A caracterização por PCR dos genes das principais famílias das ESBLs, da classe A, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M grupo 1} e da classe D, *bla*_{OXA}, segundo Ambler, foi realizada em isolados de *Escherichia coli*, provenientes do estudo de colonização fecal realizado a residentes de lares de idosos e de UCCI e em isolados responsáveis por infeções do Hospital de Braga, com fenótipo de produção de ESBL detetado na avaliação fenotípica. Os resultados da deteção de genes codificadores de β -lactamases nos isolados de *Escherichia coli* provenientes do estudo de colonização fecal a residentes de lares de idosos e de UCCI são apresentados na Tabela 14 e responsáveis por infeções do hospital de Braga na Tabela 15.

A pesquisa dos genes *bla* permitiu detetar 96 genes *bla*_{TEM}, 3 genes *bla*_{SHV}, 75 *bla*_{OXA} e 92 *bla*_{CTX-M grupo 1}. O gene *bla*_{CTX-M grupo 1} foi o predominante, isolado ou associado aos genes *bla*_{TEM}, e/ou *bla*_{OXA} nos isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs provenientes das diferentes instituições (Figura 20). Conjuntos de isolados com perfis genotípicos que incluíam apenas um gene *bla*, nomeadamente *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA} e *bla*_{CTX-M grupo 1} foram identificados em isolados de *Escherichia coli* de todas as instituições. A figura

20 evidencia os quatro perfis genotípicos predominantes, dos quais o perfil TEM, OXA e CTX-M grupo 1 foi o mais comum, identificado em 50 isolados de *Escherichia coli* das diferentes instituições, exceto nos isolados do lar de idosos 7. Os restantes perfis foram detetados num número menor, nomeadamente TEM e CTX-M grupo 1 em dezanove isolados, OXA e CTX-M grupo 1 em treze isolados e o perfil genotípico que inclui apenas o gene *bla*_{CTX-M grupo 1} em dez isolados de *Escherichia coli*. Foram identificados os perfis genotípicos *bla*_{TEM}, em dezassete isolados e *bla*_{OXA} em quatro isolados correspondendo aos perfis menos prevalentes. O gene *bla*_{SHV} foi detetado em três isolados de *Escherichia coli* responsáveis por infeções do hospital de Braga, dois dos isolados produtores de *bla*_{SHV} associado ao gene *bla*_{TEM}.

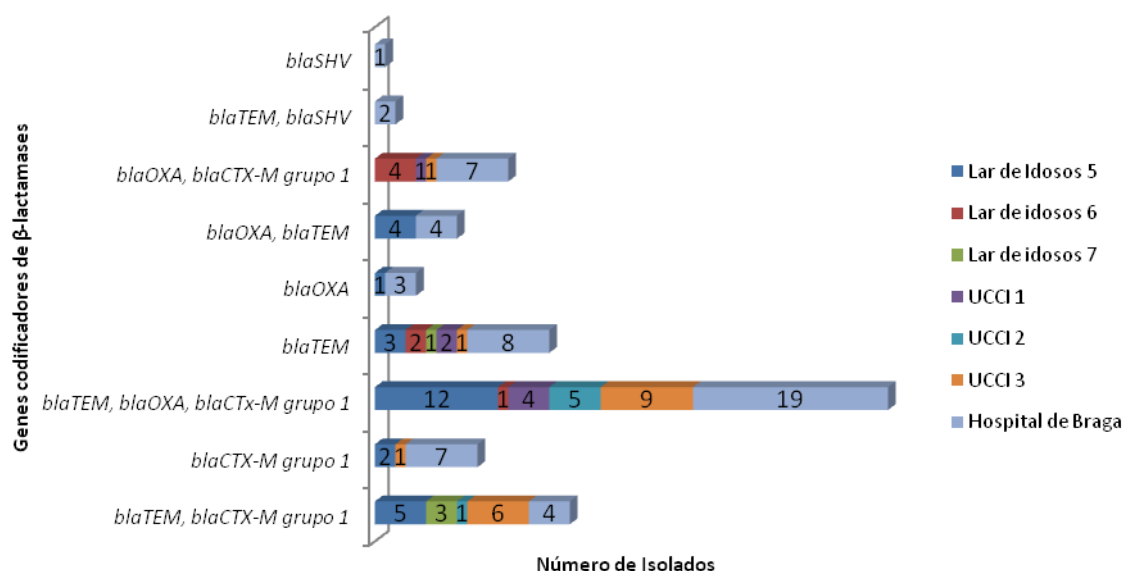


Figura 20 - Distribuição dos genes codificadores de β-lactamases nos isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs do estudo de colonização fecal e de isolados responsáveis por infeções do hospital de Braga

Isolados representativos de *Escherichia coli* produtores de ESBLs provenientes de três lares de idosos, UCCI e do hospital de Braga foram selecionados para sequenciação dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M grupo 1} e *bla*_{OXA} atendendo ao fenótipo característico da produção de ESBLs apresentado na avaliação fenotípica de suscetibilidade aos antibióticos β-lactâmicos. Dos lares de idosos foram selecionados para sequenciação cinco isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs, nomeadamente um isolado

produtor de TEM, OXA e CTX-M grupo 1 do lar de idosos 5 (LI5-33), três isolados do lar de idosos 6, dois produtores de OXA e CTX-M grupo 1 (LI6-7 e LI6-34), um isolado produtor de TEM, OXA e CTX-M grupo 1 (LI6-38) e um isolado produtor de TEM e CTX-M grupo 1 do lar 7 (LI7-4). O gene *bla*_{TEM-1} foi identificado em dois isolados, no isolado LI5-33 do lar de idosos 5 e no isolado LI6-38 do lar de idosos 6. No isolado LI7-4 o resultado da sequenciação não foi conclusivo, devido ao tamanho do fragmento ser muito pequeno, amplificando *bla*_{TEM-1}, *bla*_{TEM-104}, ou outras variantes da β -lactamase TEM. Foi identificado o gene *bla*_{OXA-1-like} nos quatro isolados selecionados produtores de OXA e o gene *bla*_{CTX-M-15} ou *bla*_{CTX-M-28} nos cinco isolados selecionados dos três lares de idosos. Das UCCI, foram selecionados nove isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs para sequenciação dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M grupo 1} e *bla*_{OXA} nomeadamente três isolados da UCCI 1, dois isolados da UCCI 2 e quatro isolados da UCCI 3. O gene *bla*_{TEM-1} foi identificado nos três isolados da UCCI 1, dois isolados da UCCI 2 e em três isolados da UCCI 3. O gene *bla*_{OXA-1-like} foi identificado nos sete isolados. O gene *bla*_{CTX-M-15} ou *bla*_{CTX-M-28} foi identificado nos isolados da UCCI 1 (n=3), UCCI 2 (n=2) e UCCI 3 (n=2) e o gene *bla*_{CTX-M-32} em dois isolados de *Escherichia coli* da UCCI 3. Nos isolados selecionados do hospital de Braga os resultados de sequenciação permitiram identificar o gene *bla*_{TEM-1} em dois isolados e cinco isolados *bla*_{TEM-1} ou *bla*_{TEM-104} ou outras variantes TEM, o gene *bla*_{OXA-1-like} (n=9) e o gene *bla*_{CTX-M-15} ou *bla*_{CTX-M-28} (n=9) nos isolados estudados.

Na tentativa de diferenciação da β -lactamase, CTX-M-15 ou CTX-M-28, foram utilizados outros primers para amplificação inequívoca do gene da β -lactamase. No entanto, não foi possível a diferenciação da β -lactamase, na região do gene que permitiria distinguir CTX-M-15 e CTX-M-28. As sequências nucleotídicas obtidas quando comparadas com as sequências do GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI) demonstravam homologia na ordem dos 90% com CTX-M-15. A diferença da sequência dos genes codificadores das β -lactamases CTX-M-15 e CTX-M-28 ocorre em duas substituições de nucleótidos, na extremidade 5' (posição 21) e na extremidade 3' (posição 865) do gene CTX-M (Menezes *et al*, 2010). A diferenciação das duas β -lactamases depende da utilização de primers que permitam amplificação da região C terminal na extremidade 3' (Menezes *et al*, 2010).

Deverá considerar-se a possibilidade de presença dos mesmos genes nos restantes isolados, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{OXA-1-like} e *bla*_{CTX-M-15/28} pois apresentam características fenotípicas e moleculares similares. Nos isolados de *Escherichia coli* produtora de ESBL nos isolados provenientes do estudo de colonização fecal de residentes de lares de idosos e de UCCI não foram detetados os genes *bla*_{SHV}. O gene *bla*_{SHV} foi detetado em

dois isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs responsáveis por infeções provenientes do hospital de Braga.

3.2 – Caracterização dos genes codificadores de mecanismos de resistência aos antibióticos não β -lactâmicos em isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs provenientes do estudo de colonização fecal e responsáveis por infeções do hospital de Braga

Os isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs provenientes do estudo de colonização fecal e responsáveis por infeções do hospital de Braga, apresentam resistência às diferentes classes de antibióticos não β -lactâmicos, nomeadamente aos aminoglicosídeos, quinolonas, tetraciclina e trimetoprim-sulfametoxazol (Tabela 14, Tabela 15, Figura 21). Os isolados de *Escherichia coli* apresentam suscetibilidade à ampicacina, netilmicina, fosfomicina, nitrofurantoína e cloranfenicol.

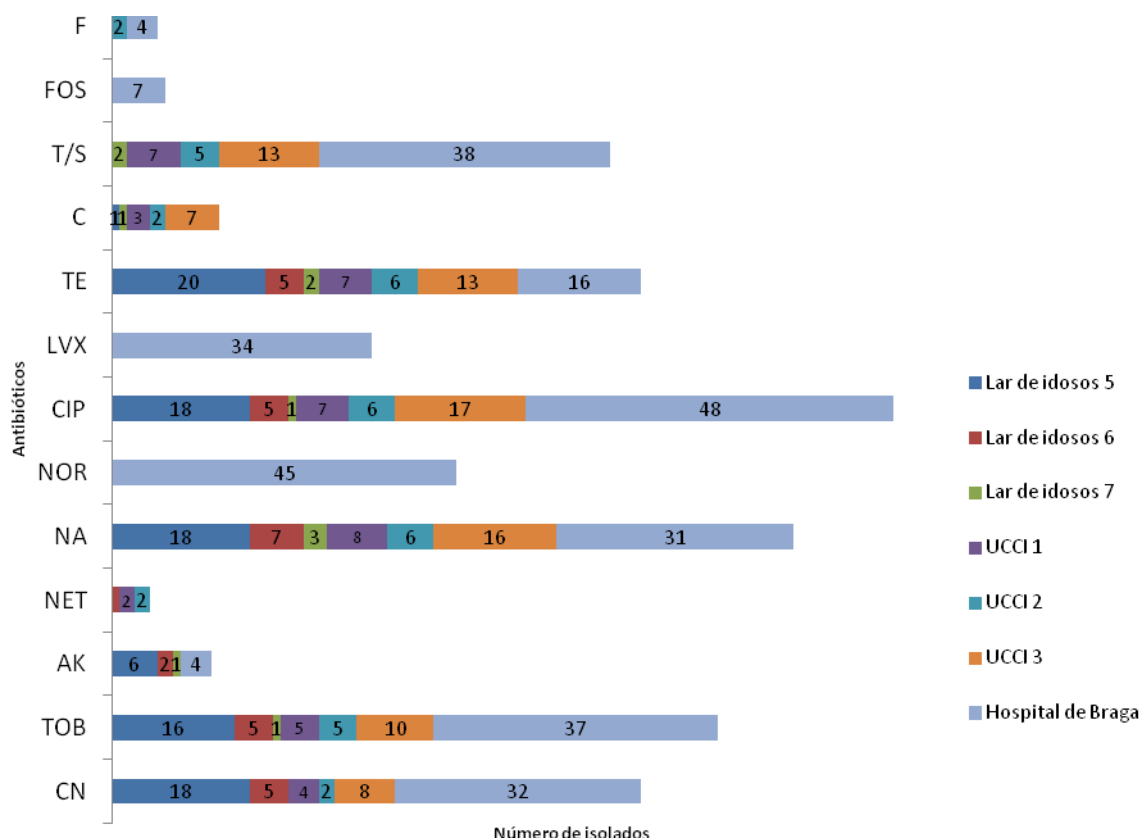


Figura 21 - Distribuição da resistência aos antibióticos não β -lactâmicos em isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs.

Legenda: CN - gentamicina, TOB - tobramicina, AK - ampicacina, NET - netilmicina, NA - ácido nalidíxico, NOR - norfloxacina, CIP - ciprofloxacina, LVX - levofloxacina, TE - tetraciclina, C - cloranfenicol, T/S - Trimetoprim/Sulfametoxazol, FOS - fosfomicina, F - nitrofurantoína.

No sentido de avaliar a possível presença de genes codificadores de resistência aos antibióticos não β -lactâmicos nos isolados de *Escherichia coli* produtora de ESBL, o estudo foi conduzido numa abordagem exploratória para detecção de alguns genes, selecionados atendendo ao fenótipo de resistência dos isolados. Foram pesquisados por PCR os genes *aac(6')-Ib-cr*, *aac(3)-IV*, *gyrA*, *qnrA*, *tetA* e *sul1*.

Os isolados de *Escherichia coli* produtora de ESBL apresentam genes de resistência a outras classes de antibióticos podendo indicar acumulação de plataformas genéticas que albergam estes genes, como os integrões. Os resultados da amplificação de genes que codificam resistência aos antibióticos não β -lactâmicos, descritos como relevantes nos isolados de *Escherichia coli* produtores de CTX-M grupo 1, confirmam a multirresistência aos antibióticos nestes isolados. Salienta-se que os isolados de *Escherichia coli* produtora de ESBL, predominantemente com o genótipo *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA} e *bla*_{CTX-M grupo 1} apresentam em associação genes de resistência aos antibióticos não β -lactâmicos, como sejam *aac(6')-Ib-cr*, *qnrA*, *aac(3)-IV*, *tetA* e *sul1*. Outros genes que codificam fatores de resistência aos antibióticos não β -lactâmicos devem ser avaliados, para cada uma das classes deste grupo de antibióticos.

A avaliação de genes que codificam resistência a antibióticos não β -lactâmicos em isolados de *Escherichia coli* produtora de ESBL permitiu identificar os genes *aac(6')-Ib-cr*, *qnrA*, *tetA*, *sul1*, *aac(3)-IV* e *gyrA* que conferem resistência a diferentes classes de antibióticos não β -lactâmicos. O gene *aac(6')-Ib-cr* é o predominante nos isolados de *Escherichia coli* produtora de ESBL, do estudo de colonização fecal e em isolados responsáveis por infeções, justificando resistência às fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (Figura 22).

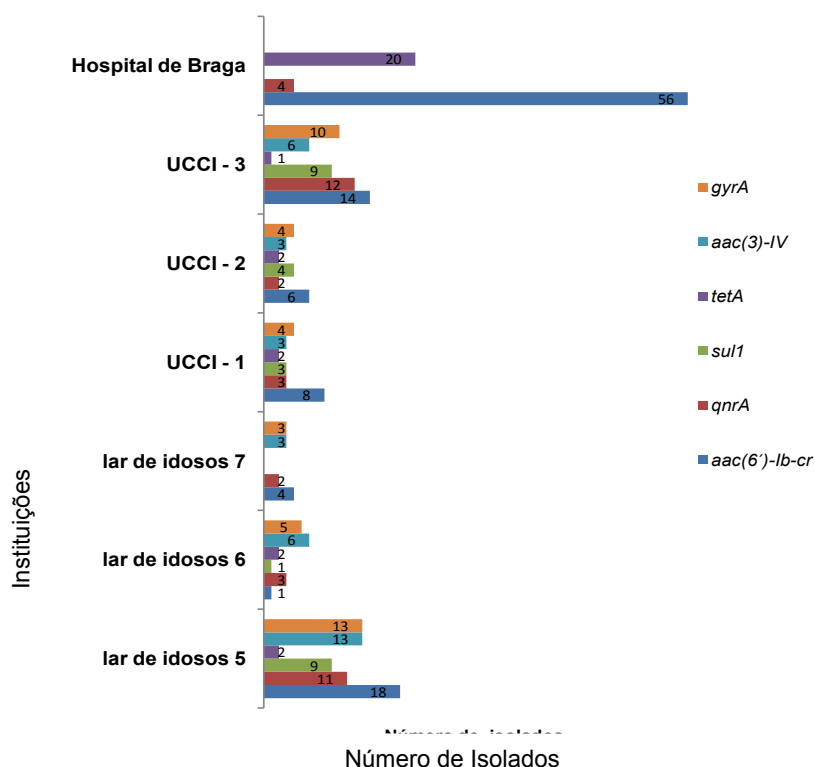


Figura 22 - Distribuição de genes codificadores de resistência aos antibióticos não β -lactâmicos em isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs

3.3 – Detecção do grupo filogenético nos isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs

A deteção dos grupos filogenéticos A, B1, B2 e D em isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs do estudo de colonização fecal a residentes de lares de idosos e de UCCI e em isolados responsáveis por infeções do hospital de Braga, foi realizada por PCR segundo descrito por Clermont e colaboradores (Clermont *et al*, 2000). A análise dos grupos filogenéticos foi efetuada com base nas diferentes combinações dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento de DNA TSPE4.C2 nos isolados de *Escherichia coli* produtora de ESBL analisados (Tabela 14 e Tabela 15).

Os isolados estudados pertencem ao grupo filogenético B2 e em menor prevalência ao grupo filogenético D e A. Não foram detetados isolados de *Escherichia coli* pertencentes aos grupos filogenéticos B1.

3.4 – Detecção do grupo clonal O25b-ST131 nos isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs

A detecção do grupo clonal O25b-ST131 pela técnica de PCR descrita por Clermont e colaboradores (Clermont *et al*, 2009) foi efetuada em isolados representativos de *Escherichia coli* produtora de ESBL do estudo de colonização fecal e responsáveis por infeções do hospital de Braga. Os isolados de *Escherichia coli* produtora de ESBL que amplificam para o alelo específico *pabB*, foram considerados pertencentes ao grupo clonal O25b-ST131 (Clermont *et al*, 2009).

Os isolados de *Escherichia coli* do grupo clonal O25b-ST131 são produtores de ESBLs do tipo CTX-M grupo 1 possivelmente CTX-M-15 e do grupo filogenético B2 (Tabela 14 e Tabela 15). Dois isolados de *Escherichia coli* produtores de CTX-M-32, do estudo de colonização fecal a residentes da UCCI 3, são do grupo clonal O25b-ST131 detetado por PCR. Os isolados de *Escherichia coli* em que não se obteve amplificação do alelo específico *pabB* por PCR foram considerados não pertencentes ao grupo clonal O25b-ST131.

3.5 – Caracterização dos fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs

Foram pesquisados genes codificadores de fatores de virulência por PCR em isolados de *Escherichia coli* produtora de ESBL do estudo de colonização fecal no sentido de avaliar o potencial virulento destes isolados. Os mesmos fatores de virulência foram estudados em isolados representativos responsáveis por infeções do hospital de Braga, provenientes na sua maioria de amostras de urina de doentes com infeção do trato urinário e infeção renal, identificados nos diferentes serviços da unidade hospitalar (Figura 23).

O gene *PAI* foi detetado em 59 isolados de *Escherichia coli* em isolados responsáveis por infeções do hospital de Braga e provenientes do estudo de colonização fecal, exceto nos isolados de colonização de residentes da UCCI 2. Em relação às fímbrias foram detetados 6 genes codificadores de *papEF* em isolados do lar de idosos 5 e de infeção; 3 genes *papallele II* em isolados de infeção; 7 genes *afaldraBC* em isolados do lar de idosos 5 e da UCCI 3; 39 genes *fimH* em isolados de colonização fecal, exceto da UCCI 2, e em isolados de infeção. Foram identificados 14 genes *cnf-1*, exceto em

isolados do lar de idosos 7 e da UCCI 1, que codificam uma toxina. Em relação aos genes que codificam sideróforos foram identificados 69 genes *FyuA* e 71 genes *chuA*. O gene *KpsMT K5* em 59 isolados de *Escherichia coli* proveniente das diferentes instituições. Os genes *traT*, *vat* e *yfcV* foram identificados em 38, 12 e 69 isolados de *Escherichia coli* provenientes das diferentes instituições, exceto o gene *vat* que não foi detetado em isolados da UCCI 2.

Os genes *papAH*, *papC*, *papG*, *sfalfocDE*, *sfaS*, *focG*, *bmaE*, *gafD*, *nfaE*, *hlyA*, *cdt B*, *iutA*, *kpsMTII*, *KpsMT K1* e *KpsMTIII* não foram detetados no conjunto de isolados de *Escherichia coli* estudados.

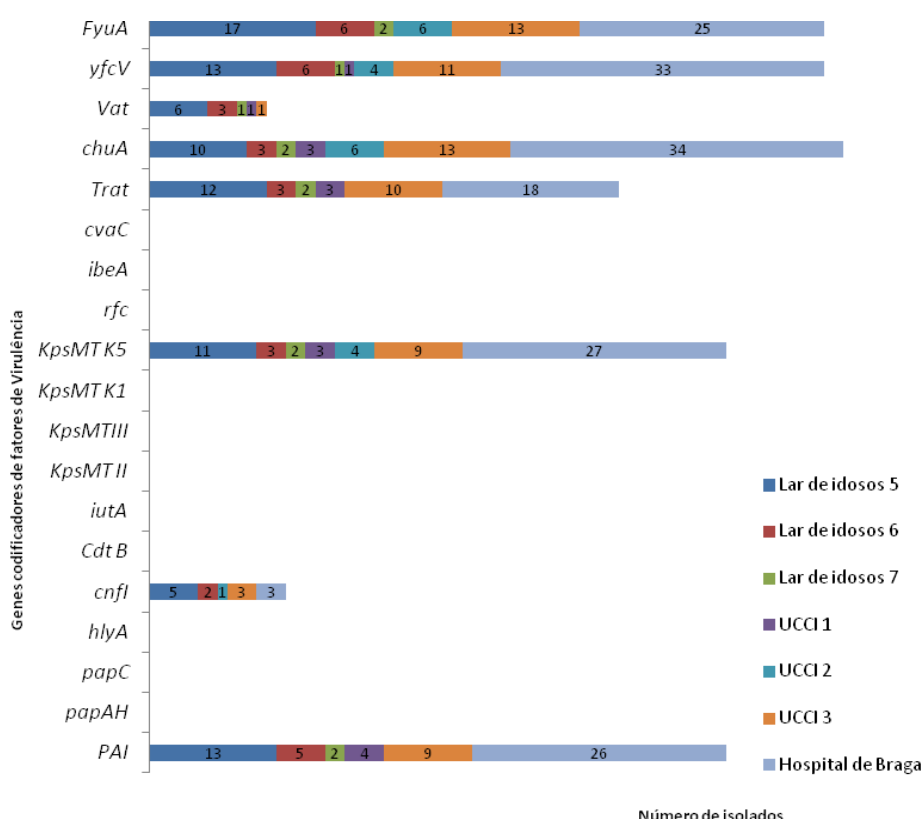


Figura 23 - Distribuição dos genes de virulência detetados nos isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs do estudo de colonização fecal e isolados responsáveis por infeções do Hospital de Braga

Com o objetivo de sintetizar os resultados, as informações acerca de caracterização molecular dos isolados de *Escherichia coli* colonizadores de trato intestinal e responsáveis por infeções, as Tabela 14 e Tabela 15 apresentam um resumo dos resultados de caracterização molecular dos genes de resistência aos antibióticos, fatores de virulência, determinação do grupo filogenético e do grupo clonal O25b-ST131 bem como das relações de clonalidade dos isolados por PFGE.

Tabela 14 - Caracterização molecular e relações clonais de isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs provenientes de residentes de lares de idosos e de UCCI

Lar de idosos/ UCCI (Data)	Isolado	Gene da β -lactamase	Fenótipo de resistência aos antibióticos não β - lactâmicos	Genes de resistência aos antibióticos não beta- lactâmicos	Grupo Filogenético	Grupo Clonal O25b-ST131 ^a	Fatores de Virulência	PFGE
Lar de idosos 5 (Jun, 08)	LI5-2	TEM, CTX-M grupo 1	S, CN, NA CIP, TE	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	na	+	<i>Vat</i>	
	LI5-4	TEM, CTX-M grupo 1	CN, NA, CIP, TE	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IV, gyrA</i>	B2	+	<i>PAI, papEF, fimH, fyuA, traT</i>	XXXIII
	LI5-8	CTX-M grupo 1	CN, TOB, AK, NA, CIP, TE	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IV, gyrA, qnrA, sul1</i>	B2	+	<i>PAI, fimH, fyuA, chuA, traT, yfcV</i>	XX
	LI5-11	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, NA, CIP, TE	<i>aac(6')-Ib-cr, gyrA, sul1</i>	na	+	<i>fyuA, KpsMTK5, Vat</i>	II
	LI5-12	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, AK, NA, CIP, TE	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IV, gyrA</i>	B2	+	<i>PAI, papEF, fimH, fyuA, Vat</i>	IV
	LI5-17	TEM, CTX-M grupo 1	CN, TOB, AK, NA, CIP, TE	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IV, gyrA, qnrA</i>	B2	+	<i>PAI, fimH, cnf, fyuA, KpsMTK5, traT, yfcV</i>	IV
	LI5-18	TEM	TE	<i>gyrA, sul1</i>	D	-	<i>PAI, fimH, fyuA, chuA, VAT, yfcV, KpsMTK5, TRAT</i>	XXV
	LI5-22	TEM, CTX-M grupo 1	CN, TOB, NA, CIP, TE	<i>aac(6')-Ib-cr, qnrA, sul1</i>	B2	+	<i>PAI, fimH, fyuA, traT, VAT, yfcV, KpsMTK5, cnf, chuA</i>	XXVI
	LI5-26	CTX-M grupo 1	CN, TOB, AK, NA, CIP, TE	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IV, qnrA, gyrA</i>	B2	+	<i>yfcV, KpsMTK5, VAT</i>	IV
	LI5-33	TEM-1, OXA-1 (like), CTX-M 15/28	CN, TOB, NA, CIP, TE	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IV, qnrA, gyrA, tetA, sul1</i>	B2	+	<i>PAI, papEF, afadraBC, fimH, cnf, fyuA, KpsMTK5, traT, yfcV</i>	IV

Legenda: Jun, 08 - Junho, 2008; Jul, 08 - Julho, 2008; Mar, 09 - Março, 2009; Jan-Fev, 12 - Janeiro-Fevereiro, 2012; *** - não foram detetados os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M grupo 1}; ** antibióticos não β -lactâmicos: CN - gentamicina, NET - netilmicina, TOB - tobramicina, AK - amicacina, NA - ácido nalidíxico, NXN - norfloxacin, CIP - ciprofloxacina, LVX - levofloxacina, TE - tetraciclina, C - cloranfenicol, FOS - fosfomicina, F - nitrofurantoína, T/S - trimetoprim/sulfametoxazol; ^a - Detecção do grupo clonal O25B-ST131 por PCR segundo Clermont e colaboradores (Clermont *et al*, 2009); na - não avaliado.

Tabela 14 (continuação) - Caracterização molecular e relações clonais de isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs provenientes de residentes de lares de idosos e de UCCI

Lar de idosos e/ou UCCI (Data)	Isolado	Gene da β -lactamase	Fenótipo de resistência aos antibióticos não β -lactâmicos	Genes de resistência aos antibióticos não beta-lactâmicos	Grupo Filogenético	Grupo Clonal O25b-ST131 ^a	Fatores de Virulência	PFGE
Lar de idosos 5 (Jun, 08)	LI5-34	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, AK, NA, CIP, TE	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aac(3)-IV</i> , <i>qnrA</i> , <i>gyrA</i> , <i>sul1</i>	B2	na	PAI, <i>fimH</i> , <i>cnf</i> , <i>fyuA</i> , <i>chuA</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>traT</i> , <i>yfcV</i>	IV
	LI5-36	TEM, CTX-M grupo 1	CN, TOB, NA, CIP, TE	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aac(3)-IV</i> , <i>qnrA</i> , <i>gyrA</i> , <i>sul1</i>	B2	+	<i>KpsMTK5</i> , <i>fyuA</i> , <i>FycV</i>	XXVI
	LI5-37	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, NA, CIP, TE	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	B2	na	<i>fyuA</i> , <i>chuA</i> , <i>yfcV</i>	
	LI5-38	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, NA, CIP, TE	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	B2	+	<i>fyuA</i> , <i>chuA</i> , <i>yfcV</i>	IV
	LI5-39	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, NA, CIP, TE	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aac(3)-IV</i> , <i>qnrA</i> , <i>gyrA</i> , <i>sul1</i>	B2	+	PAI, <i>fimH</i> , <i>fyuA</i> , <i>chuA</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>traT</i> , <i>yfcV</i>	IV
	LI5-40	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, NA, CIP, TE	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aac(3)-IV</i> , <i>qnrA</i> , <i>gyrA</i> , <i>sul1</i>	B2	+	PAI, <i>fimH</i> , <i>cnf</i> , <i>fyuA</i> , <i>chuA</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>traT</i> , <i>yfcV</i>	III
	LI5-41	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, NA, CIP, TE	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aac(3)-IV</i> , <i>qnrA</i> , <i>gyrA</i> , <i>sul1</i>	B2	+	PAI, <i>fimH</i> , <i>fyuA</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>traT</i> , <i>yfcV</i>	IV
	LI5-42	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, NA, CIP, TE	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aac(3)-IV</i> , <i>qnrA</i> , <i>gyrA</i> , <i>tetA</i> , <i>sul1</i>	B2	+	PAI, <i>fimH</i> , <i>cnf</i> , <i>fyuA</i> , <i>chuA</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>traT</i> , <i>yfcV</i>	IV
	LI5-43	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, AK, NA, CIP, TE	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aac(3)-IV</i> , <i>gyrA</i> , <i>sul1</i>	B2	+	<i>fyuA</i> , <i>chuA</i>	IV
	LI5-51	OXA	S, CN, TOB, NA, CIP, TE, C	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>gyrA</i>	B2	na	PAI, <i>fimH</i> , <i>fyuA</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>traT</i>	XXXVIII

Legenda: Jun, 08 - Junho, 2008; Jul, 08 - Julho, 2008; Mar, 09 - Março, 2009; Jan-Fev, 12 - Janeiro-Fevereiro, 2012; *** - não foram detetados os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M grupo 1}; ** antibióticos não β -lactâmicos: CN - gentamicina, NET - netilmicina, TOB - tobramicina, AK - amikacina, NA - ácido nalidíxico, NOR - norfloxacin, CIP - ciprofloxacina, LVX - levofloxacina, TE - tetraciclina, C - cloranfenicol, FOS - fosfomicina, F - nitrofurantoína, T/S - trimetoprim/sulfametoxazol; ^a - Detecção do grupo clonal O25b-ST131 por PCR segundo Clermont e colaboradores (Clermont *et al*, 2009); na - não avaliado.

Tabela 14 (continuação) - Caracterização molecular e relações clonais de isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs provenientes de residentes de lares de idosos e de UCCI

Lar de idosos/ UCCI (Data)	Isolado	Gene da β -lactamase	Fenótipo de resistência aos antibióticos não β - lactâmicos	Genes de resistência aos antibióticos não beta- lactâmicos	Grupo Filogenético	Grupo Clonal O25b-ST131 ^a	Fatores de Virulência	PFGE
Lar de idosos 6 (Jul, 2008)	LI6-7	OXA-1 (like), CTX-M 15/28	CN, TOB, NA, CIP, TE	<i>qnrA</i> , <i>gyrA</i>	B2	+	<i>fyuA</i> , <i>yfcV</i>	IV
	LI6-12	TEM	NA	<i>aac(3)-IV</i>	na	+	PAI, <i>fimH</i> , <i>fyuA</i> , <i>chuA</i> , <i>traT</i> , <i>vat</i> , <i>yfcV</i>	na
	LI6-17	TEM	S, NET, NA	<i>aac(3)-IV</i> , <i>gyrA</i>	B2	-	PAI, <i>fimH</i> , <i>cnf</i> , <i>fyuA</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>traT</i> , <i>vat</i>	XVI
	LI6-18	OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, NA, CIP, TE	<i>aac(3)-IV</i> , <i>gyrA</i>	B2	+	<i>fyuA</i> , <i>chuA</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>yfcV</i>	V
	LI6-19	OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, NA, CIP, TE	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aac(3)-IV</i> , <i>qnrA</i> , <i>gyrA</i> , <i>tetA</i>	B2	na	PAI, <i>fimH</i> , <i>fyuA</i> , <i>chuA</i> , <i>traT</i> , <i>yfcV</i>	XX
	LI6-34	OXA-1(like), CTX-M 15/28	CN, TOB, AK, NA, CIP, TE	<i>aac(3)-IV</i> , <i>qnrA</i> , <i>gyrA</i> , <i>tetA</i> , <i>sul1</i>	B2	+	PAI, <i>cnf</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>fyuA</i> , <i>yfcV</i>	V III
	LI6-38	TEM-1, OXA-1(like), CTX-M 15/28	CN, TOB, AK, NA, CIP, TE	<i>aac(3)-IV</i> , <i>gyrA</i>	B2	+	PAI, <i>fimH</i> , <i>fyuA</i> , <i>vat</i> , <i>traT</i>	VIII
Lar de idosos 7 (Mar, 09)	LI7-1	neg para todos	TOB, NA	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aac(3)-IV</i> , <i>gyrA</i>	na	+	PAI, <i>fimH</i>	XXXIV
	LI7-4	TEM(-1, -104,...), CTX-M 15/28	S, NA, CIP, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aac(3)-IV</i> , <i>qnrA</i> , <i>gyrA</i>	B2	+	PAI, <i>fimH</i> , <i>fyuA</i> , <i>chuA</i> , <i>traT</i> , <i>yfcV</i>	na
	LI7-5	TEM	S, TE	<i>aac(3)-IV</i> , <i>qnrA</i> , <i>gyrA</i>	na	na	<i>KpsMTK5</i>	na
	LI7-24	TEM, CTX-M grupo 1	S, AK, NA, TE, C	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	na	+	<i>fimH</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>vat</i>	na
	LI7-57	TEM, CTX-M grupo 1	T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	na	+	<i>fimH</i> , <i>fyuA</i> , <i>chuA</i> , <i>traT</i>	na

Legenda: Jun, 08 - Junho, 2008; Jul, 08 - Julho, 2008; Mar, 09 - Março, 2009; Jan-Fev, 12 - Janeiro-Fevereiro, 2012; *** - não foram detetados os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M grupo 1}; ** antibióticos não β -lactâmicos: CN - gentamicina, NET - netilmicina, TOB - tobramicina, AK - ampicilina, NA - ácido nalidixico, NOR - norfloxacina, CIP - ciprofloxacina, LVX - levofloxacina, TE - tetraciclina, C - cloranfenicol, FOS - fosfomicina, F - nitrofurantoína, T/S - trimetoprim/sulfametoxazol; ^a - Detecção do grupo clonal O25b-ST131 por PCR segundo Clermont e colaboradores (Clermont *et al*, 2009); na - não avaliado.

Tabela 14 (continuação) - Caracterização molecular e relações clonais de isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs provenientes de residentes de lares de idosos e de UCCI

Lar de idosos/ UCCI (Data)	Isolado	Gene da β -lactamase	Fenótipo de resistência aos antibióticos não β -lactâmicos	Genes de resistência aos antibióticos não beta-lactâmicos	Grupo Filogenético	Grupo Clonal O25b-ST131 ^a	Fatores de Virulência	PFGE
UCCI 1 (Abril, 09)	UC1-2	TEM-1, OXA-1(like), CTX-M 15/28	S, CN, TOB, NA, CIP, TE, T/S	<i>acc(6')-lb-cr, gyrA, sul1</i>	B2	+	PAI, <i>fimH</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>traT</i>	XXIII
	UC1-7	OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, NA, CIP, TE, T/S, F	<i>aac(6')-lb-cr, qnrA, tetA</i>	B2	+	PAI, <i>fimH</i> , <i>traT</i>	XXII
	UC1-10	TEM	S, CN, TOB, NA, CIP, T/S, TE	<i>aac(6')-lb-cr, aac(3)-IV</i>	D	+		VIII
	UC1-11	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, NET, NA, CIP, T/S, TE	<i>aac(6')-lb-cr, aac(3)-IV, qnrA, gyrA</i> , <i>sul1</i>	B2	na	PAI, <i>fimH</i> , <i>chuA</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>vat</i> , <i>yfcV</i>	XXII
	UC1-12	TEM-1, OXA-1 (like), CTX-M 15/28	S, TOB, NET, NA, CIP, T/S, TE, C	<i>aac(6')-lb-cr, gyrA, sul1</i>	B2	+		XXVI
	UC1-13	TEM-1, OXA-1(like), CTX-M grupo 15/28	S, NA, CIP, T/S	<i>aac(6')-lb-cr, aac(3)-IV, qnrA, gyrA</i> , <i>tetA</i>	B2	+	PAI, <i>fimH</i> , <i>chuA</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>traT</i>	XIII
	UC1-16	TEM	NA, CIP, T/S, TE, C	<i>aac(6')-lb-cr</i>	D	+		XI
	UC1-19	***	S, NA, T/S, TE, C	<i>aac(6')-lb-cr</i>	D	+		I
UCCI 2 (Abril, 09)	UC2-2	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	TOB, NA, CIP, TE, T/S, C, F	<i>aac(6')-lb-cr</i>	B2	+	<i>FyuA, chuA</i>	XXII
	UC2-4	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	NA, CIP, TE, T/S, C, F	<i>aac(6')-lb-cr, aac(3)-IV, qnrA, gyrA</i> , <i>tetA</i>	B2	+	<i>afaldraBC, FuyA, chuA</i> , <i>KpsMTK5, yfcV</i>	XXVI
	UC2-9	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	S, CN, TOB, NA, CIP, TE	<i>aac(6')-lb-cr, gyrA</i>	B2	+	<i>FuyA, chuA, KpsMTK5</i> , <i>yfcV</i>	XXVI
	UC2-10	TEM -1, CTX-M 15/28	S, TOB, NET, NA, CIP, TE, T/S	<i>aac(6')-lb-cr, aac(3)-IV, qnrA, gyrA</i> , <i>sul1</i>	B2	+	<i>cnf, FuyA, chuA</i> , <i>KpsMTK5</i>	XXVI
	UC2-11	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	S, TOB, NET, NA, CIP, TE, T/S	<i>aac(6')-lb-cr, aac(3)-IV, qnrA, gyrA</i> , <i>sul1</i>	B2	+	<i>FuyA, chuA, KpsMTK5</i> , <i>yfcV</i>	XX
	UC2-12	TEM-1, OXA-1 (like), CTX-M 15/28	S, CN, TOB, NA, CIP, TE, T/S	<i>aac(6')-lb-cr, tetA, sul1</i>	B2	+	<i>FyuA, chuA, yfcV</i>	XVI

Legenda: Jun, 08 - Junho, 2008; Jul, 08 - Julho, 2008; Mar, 09 - Março, 2009; Jan-Fev, 12 - Janeiro-Fevereiro, 2012; *** - não foram detetados os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M grupo 1}; ** antibióticos não β -lactâmicos: CN - gentamicina, NET - netilmicina, TOB - tobramicina, AK - amicacina, NA - ácido nalidixico, NOR - norfloxacina, CIP - ciprofloxacina, LVX - levofloxacina, TE - tetraciclina, C - cloranfenicol, FOS - fosfomicina, F - nitrofurantoína, T/S - trimetoprim/sulfametoxazol; ^a - Detecção do grupo clonal O25b-ST131 por PCR segundo Clermont e colaboradores (Clermont *et al*, 2009); na - não avaliado.

Tabela 14 (continuação) - Caracterização molecular e relações clonais de isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs provenientes de residentes de lares de idosos e de UCCI

Lar de idosos/ UCCI (Data)	Isolado	Gene da β -lactamase	Fenótipo de resistência aos antibióticos não β - lactâmicos	Genes de resistência aos antibióticos não beta- lactâmicos	Grupo Filogenético	Grupo Clonal O25b-ST131 ^a	Fatores de Virulência	PFGE
UCCI 3 (Jan-Fev, 12)	UC3-67	TEM-1, CTX-M 32	S, NA, CIP, TE	<i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>aac(3)-IV</i> , <i>qnrA</i> , <i>gyrA</i> , <i>sul1</i>	B2	+	<i>PAI</i> , <i>fimH</i> , <i>FuyA</i> , <i>chuA</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>traT</i>	VIII
	UC3-53	TEM-1, OXA-1(like), CTX-M 15/28	S, CN, TOB, NA, CIP, TE, T/S	<i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>qnrA</i> , <i>gyrA</i> , <i>tetA</i>	B2	+	<i>PAI</i> , <i>fimH</i> , <i>FuyA</i> , <i>chuA</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>yfcV</i>	XXII
	UC3-57	TEM, CTX-M grupo 1	S, NA, CIP, TE, T/S	<i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>aac(3)-IV</i> , <i>sul1</i>	D	+	<i>PAI</i> , <i>afaldraBC</i> , <i>fimH</i> , <i>cnf</i> , <i>fuyA</i> , <i>chuA</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>traT</i>	XIII
	UC3-80	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	S, NA, CIP, TE, T/S	<i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>aac(3)-IV</i> , <i>qnrA</i> , <i>gyrA</i> , <i>sul1</i>	na	na	<i>afaldraBC</i> , <i>chuA</i> , <i>FuyA</i> , <i>yfcV</i>	na
	UC3-60	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	S, CN, TOB, NA, CIP, TE, T/S	<i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>qnrA</i>	B2	+	<i>PAI</i> , <i>fimH</i> , <i>FuyA</i> , <i>chuA</i> , <i>traT</i> , <i>yfcV</i>	XIII
	UC3-52	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	TOB, NA, CIP, C	<i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>qnrA</i> , <i>gyrA</i>	B2	+	<i>PAI</i> , <i>afaldraBC</i> , <i>fimH</i> , <i>FuyA</i> , <i>chuA</i> , <i>traT</i> , <i>yfcV</i>	XXI
	UC3-39	CTX-M grupo 1	S, CN, TOB, NA, CIP, TE, T/S, C	<i>aac(6')-lb-cr</i>	B2	+	na	X
	UC3-47	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, NA, CIP, TE, T/S	<i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>aac(3)-IV</i> , <i>qnrA</i> , <i>gyrA</i> , <i>sul1</i>	B2	+	<i>afaldraBC</i> , <i>fimH</i> , <i>FuyA</i> , <i>chuA</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>traT</i> , <i>yfcV</i>	VI
	UC3-42	TEM, CTX-M grupo 1	S, CN, TOB, NA, CIP, TE, C, T/S	<i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>qnrA</i> , <i>gyrA</i> , <i>sul1</i>	B2	+	<i>PAI</i> , <i>fimH</i> , <i>cnf</i> , <i>FuyA</i> , <i>chuA</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>yfcV</i>	na
	UC3-73	TEM	S, NA, CIP, TE, C	<i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>qnrA</i> , <i>gyrA</i> , <i>sul1</i>	B2	+	na	II

Legenda: Jan-Fev, 12 - Janeiro-Feveireiro, 2012; *** - não foram detetados os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M grupo 1}; ** antibióticos não β -lactâmicos: CN - gentamicina, NET - netilmicina, TOB - tobramicina, AK - amicacina, NA - ácido nalidíxico, NOR - norfloxacin, CIP - ciprofloxacina, LVX - levofloxacina, TE - tetraciclina, C - cloranfenicol, FOS - fosfomicina, F - nitrofurantoína, T/S - trimetoprim/sulfametoxazol; ^a - Detecção do grupo clonal O25b-ST131 por PCR segundo Clermont e colaboradores (Clermont *et al*, 2009); na - não avaliado.

Tabela 14 (continuação) - Caracterização molecular e relações clonais de isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs provenientes de residentes de lares de idosos e de UCCI

Lar de idosos/ UCCI (Data)	Isolado	Gene da β -lactamase	Fenótipo de resistência aos antibióticos não β - lactâmicos	Genes de resistência aos antibióticos não beta- lactâmicos	Grupo Filogenético	Grupo Clonal O25b-ST131 ^a	Fatores de Virulência	PFGE
UCCI 3 (Jan-Fev, 12)	UC3-70	TEM, CTX-M grupo 1	S, CN, NA, CIP, TE, T/S		B2	na		XXVII
	UC3-83	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	S, NA, CIP, TE, T/S, C	<i>aac(6')-Ib-cr, qnrA, gyrA, sul1</i>	B2	na	<i>PAI, afaldraBC, fimH, cnf, fyuA, chuA, KpsMTK5, traT, yfcV</i>	na
	UC3-88	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	S, CIP, TE, T/S, C	<i>aac(6')-Ib-cr, qnrA, sul1</i>	B2	+	<i>PAI, fimH, fyuA, chuA, traT, KpsMTK5, yfcV</i>	XIII
	UC3-89	TEM, CTX-M grupo 1	S, CN, TOB, NA, CIP, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	A	+	<i>fimH, chuA TRAT yfcV</i>	na
	UC3-49	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	S, CN, TOB, NA, CIP, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IV, qnrA, gyrA, sul1</i>	B2	+	<i>PAI, fimH, fyuA, chuA KpsMTK5, traT, vat</i>	XXII
	UC3-55	TEM-1, OXA-1(like), CTX-M-32	S, TOB, NA, CIP, TE, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IV, qnrA, gyrA</i>	B2	+	<i>afaldraBC, fimH, fyuA, chuA, KpsMTK5, traT, yfcV</i>	II
	UC3-75	OXA-1(like), CTX-M 15/28	S, TOB, NA, CIP, C		B2	+	<i>FuyA, yfcV</i>	VIII

Legenda: Jan-Fev, 12 - Janeiro-Fevereiro, 2012; *** - não foram detetados os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M grupo 1}; ** antibióticos não β -lactâmicos: CN - gentamicina, NET - netilmicina, TOB - tobramicina, AK - amicacina, NA - ácido nalidíxico, NOR - norfloxacin, CIP - ciprofloxacina, LVX - levofloxacina, TE - tetraciclina, C - cloranfenicol, FOS - fosfomicina, F - nitrofurantoina, T/S - trimetoprim/sulfametoxazol; ^a - Detecção do grupo clonal O25b-ST131 por PCR segundo Clermont e colaboradores (Clermont *et al*, 2009)

Tabela 15 – Caracterização molecular e relações clonais de isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs responsáveis por infecções do Hospital de Braga

Isolado (Data)	Idade/ Sexo	Serviço	Produto Biológico	Gene da β -lactamase	Resistências Associadas	Genes de resistência a antibióticos não β -lactâmicos	Grupo Filogenético	Grupo clonal O25B-ST131	Fatores de Virulência	PFGE
HB4 (Fev, 09)	72/F	Urgência	Expectoração	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, LVX	<i>aac(6')-lb-cr</i>	B2	+	PAI, <i>FuyA</i> , <i>chuA</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>TRAT</i>	XXII
HB5 (Fev, 09)	72/F	Urgência	Urina	OXA	TOB, NA, NOR, LVX, FOS	<i>aac(6')-lb-cr</i>	na	na	<i>chuA</i>	na
HB6 (Fev, 09)	65/F	Consulta-Urologia	Urina	TEM	♦	<i>aac(6')-lb-cr</i>	na	na	na	na
HB8 (Fev, 09)	46/F	Urologia	Pús perineal	CTX-M grupo 1	LVX, T/S	<i>aac(6')-lb-cr</i>	A	+	<i>chuA</i>	na
HB9 (Fev, 09)	55/M	MFR	Urina	OXA	CN, TOB, NA, NOR, CIP, LVX, T/S	<i>aac(6')-lb-cr</i>	na	na	<i>chuA</i>	na
HB18 (Fev, 09)	85/M	Urgência	Urina	TEM, CTX-M grupo 1	CN, NOR, CIP, LVX, TE, T/S	<i>aac(6')-lb-cr</i>	B2	+	PAI, <i>FuyA</i> , <i>chuA</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>TraT</i>	XXVII
HB21 (Fev, 09)	79,M	Medicina interna	Hemocultura	TEM, CTX-M grupo 1	CN, TOB, NOR, CIP, LVX	<i>aac(6')-lb-cr</i>	B2	+	PAI, <i>FuyA</i> , <i>chuA</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>TraT</i>	na
HB22 (Fev, 09)	78/F	Cons-MFR	Urina	TEM (-1, -104,...), OXA-1 (like), CTX-M 15/28	TOB, CIP, LVX	<i>aac(6')-lb-cr</i>	na	+	na	na
HB25 (Fev, 09)	58/F	Medicina interna	Urina	TEM, SHV	♦	<i>aac(6')-lb-cr</i>	B2	+	<i>FuyA</i> , <i>chuA</i> , <i>yfcV</i>	XXVI
HB26 (Fev, 09)	57/M	Consulta urologia	Urina	TEM, SHV	CN, TOB, NOR, CIP, LVX, TE, T/S, F	<i>aac(6')-lb-cr</i>	B2	na	PAI, <i>KpsMTK5</i>	na
HB27 (Fev, 09)	53/M	MFR	Urina	OXA-1(like), CTX-M 15/28	CN, TOB, NOR, CIP, LVX, TE, T/S	<i>aac(6')-lb-cr</i>	B2	+	PAI, <i>papallele II</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>FuyA</i> , <i>chuA</i> , <i>TraT</i>	XIV
HB28 (Fev,09)	81/F	Consulta Medicina interna	Urina	TEM	TE	<i>aac(6')-lb-cr</i>	na	na	<i>papEF</i> , <i>fimH</i>	na
HB32 (Mar,09)	55/M	MFR	Urina	TEM	CN, TOB, LVX, T/S	<i>aac(6')-lb-cr</i>	B2	na	PAI, <i>cnf</i> , <i>KpsMTK5</i>	na
HB42 (Mar,09)	59/F	Cons-MFR	Líquido peritoneal	CTX-M grupo 1	♦	<i>aac(6')-lb-cr</i>	B2	-	<i>chuA</i> , <i>FuyA</i>	XXXV
HB52 (Mar,09)	70/F	Cirurgia	Hemocultura	OXA, CTX-M grupo 1	TOB, NOR, CIP, LVX, TE	<i>aac(6')-lb-cr</i>	B2	+	<i>papEF</i> , <i>fimH</i> , <i>FuyA</i> , <i>chuA</i> , <i>yfcV</i>	XXIII

Legenda: I/S - Idade/Sexo; Fev, 09 - Fevereiro de 2009; Mar, 09 - Março de 2009; Abr, 09 - Abril de 2009; Fev, 12 - Fevereiro de 2012; Mar, 12 - Março de 2012; ^a – zaragatoa cutânea na escara da sacro; AK - amicacina, C - cloranfenicol, CIP - ciprofloxacina, FOS - fosfomicina, CN - gentamicina, LVX - levofloxacina, NET - netilmicina, F - nitrofurantoina, NOR - norfloxacina, TOB - tobramicina, T/S - Trimetoprim/Sulfametoxazol; ♦ - o isolado de *Escherichia coli* não apresenta resistência aos antibióticos testados no equipamento automatizado Vitek e/ou Walkway; Ø – não se detetou amplificação nas reacções de PCR para os genes codificadores de β -lactamases pesquisados: *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M do grupo 1}; na - não avaliado.

Tabela 15 (continuação) - Caracterização molecular e relações clonais de isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs responsáveis por infeções do Hospital de Braga

Isolado (Data)	Idade/ Sexo	Serviço	Produto Biológico	Gene da lactamase	β-Resistências Associadas	Genes de resistência a antibióticos não β-lactâmicos	Grupo Filogenético	Grupo clonal O25b-ST131	Fatores de Virulência	PFGE
HB53 (Mar,09)	59/F	Urgência	Urina	SHV	CN, TOB, NOR, CIP, LVX	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	B2	na	PAI, <i>chuA</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>TraT</i>	na
HB55 (Mar,09)	38/M	Cons-MFR	Urina	OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, NA, NOR, CIP, LVX, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	B2	+	<i>FuyA</i> , <i>chuA</i> , <i>yfcV</i>	XXII
HB63 (Abr,09)	55/M	MFR	Urina	OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, NA, NOR, CIP, LVX, T/S, FOS	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	B2	+	<i>chuA</i> , <i>yfcV</i>	XXII
HB65 (Abr,09)	56/M	Urgência	Urina	TEM, OXA	CN, TOB, NOR, CIP, LVX, TE	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	B2	na	PAI, <i>chuA</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>traT</i>	na
HB66 (Abr,09)	66/F	Urgência	Urina	TEM (-1, -104,...), OXA-1 (like), CTX-M 15/28	CN, TOB, NOR, CIP, LVX, TE, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>qnrA</i> , <i>tetA</i>	B2	+	PAI, <i>FuyA</i> , <i>chuA</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>yfcV</i>	XXII
HB67 (Abr,09)	78/M	Urologia	Urina	TEM	NOR, CIP, LVX, F, TE	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	na	na	PAI, <i>papallele II</i>	na
HB68 (Mar,09)	77/F	Urologia	Urina	TEM, CTX-M grupo 1	NOR, CIP, LVX, TE	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	na	na	<i>FuyA</i>	na
HB69 (Mar,09)	55/M	Urgência	Urina	OXA, CTX-M grupo 1	NOR, CIP, LVX, TE	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	na	+	<i>chuA</i> , <i>yfcV</i>	na
HB79 (Mar,09)	42/M	MFR	Urina	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, NOR, NA, CIP, LVX, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>qnrA</i>	B2	+	PAI, <i>traT</i>	XVIII
HB80 (Abr,09)	64/F	Cirurgia plástica	Urina	Negativo	NOR, NA, CIP, LVX, T/S	<i>tetA</i>	na	+	<i>yfcV</i>	na
HB90 (Abr,09)	67/F	Neurologia	Urina	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, NOR, NA, CIP, LVX, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>tetA</i>	B2	na	PAI, <i>KpsMTK5</i> , <i>traT</i> , <i>yfcV</i>	IV
HB93 (Mai,09)	47/M	UCIP	Urina	CTX-M grupo 1	CN, NOR, NA, CIP, LVX, T/S	na	na	na	PAI, <i>KpsMTK5</i>	na
HB105 (Mai,09)	55/F	Medicina interna	Urina	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, NOR, CIP, LVX, TE, T/S	<i>tetA</i>	B2	na	PAI, <i>KpsMTK5</i> , <i>traT</i> , <i>yfcV</i>	XXIX
HB106 (Mai,09)	80/F	Medicina interna	Hemocultura	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, CIP, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	na	+	PAI, <i>chuA</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>yfcV</i>	na
HB111 (Mai,09)	79/M	Medicina interna	Urina	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, NOR, CIP, LVX, TE, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>qnrA</i>	B2	+	PAI, <i>KpsMTK5</i> , <i>yfcV</i>	XXII

Legenda: I/S - Idade/Sexo; Fev, 09 - Fevereiro de 2009; Mar, 09 - Março de 2009; Abr, 09 - Abril de 2009; Fev, 12 - Fevereiro de 2012; Mar, 12 - Março de 2012; ^a - zaragatoa cutânea na escara da sacro; AK - amicacina, C - cloranfenicol, CIP - ciprofloxacina, FOS - fosfomicina, CN - gentamicina, LVX - levofloxacina, NET - netilmicina, F - nitrofurantoina, NOR - norfloxacina, TOB - tobramicina, T/S - Trimetoprim/Sulfametoxazol; ♦ - o isolado de *Escherichia coli* não apresenta resistência aos antibióticos testados no equipamento automatizado Vitek e/ou Walkway; Ø - não se detetou amplificação nas reacções de PCR para os genes codificadores de β-lactamases pesquisados: *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} do grupo 1; na - não avaliado.

Tabela 15 (continuação) - Caracterização molecular e relações clonais de isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs responsáveis por infeções do Hospital de Braga

Isolado (Data)	Idade/ Sexo	Serviço	Produto Biológico	Gene da β-lactamase		Resistências Associadas	Genes de resistência a antibióticos não β-lactâmicos	Grupo Filogenético	Grupo clonal O25b-ST131	Fatores de Virulência	PFGE
HB117 (Jun,09)	68/M	Medicina interna	Urina	OXA-1(like), grupo 15/28	CTX-M	CN, TOB, NOR, NA, CIP, LVX, T/S, FOS	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	B2	+	PAI, <i>KpsMTK5</i>	IX
HB119 (Jun,09)	43/M	MFR	Urina	CTX-M grupo 1		CN, TOB, NOR, NA, CIP, LVX, FOS, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	B2	+	<i>cnf</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>traT</i> , <i>yfcV</i>	VIII
HB122 (Jun,09)	55/M	MFR	Urina	TEM (-1, -104,...), OXA-1 (like), CTX-M 15/28		CN, NOR, TOB, NA, CIP, LVX, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>tetA</i>	B2	+	PAI, <i>papAllele II</i> , <i>cnf</i> , <i>chuA</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>traT</i> , <i>yfcV</i>	VIII
HB130 (Jul,09)	77/F	Medicina interna	Urina	TEM, CTX-M grupo 1		NOR, NA, CIP, LVX	<i>tetA</i>	B2	+	<i>yfcV</i>	VIII
HB131 (Jun,09)	74/M	Consulta nefrologia	Urina	TEM (-1,-104,...), OXA-1 (like), CTX-M 15/28		CN, TOB, NOR, CIP, LVX, TE, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>tetA</i>	B2	+	PAI, <i>KpsMTK5</i>	na
HB132 (Jun,09)	78/M	Consulta urologia	Urina	Ø		♦		B2	+	<i>chuA</i> , <i>yfcV</i>	XXXVIII
HB133 (Jun,09)	71/F	Urgência	Urina	Ø		TE, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	B2	na		na
HB144 (Jun,09)	63/M	Hospital de dia	Urina	TEM		CN, TE, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	B2	+	<i>KpsMTK5</i> , <i>traT</i>	XII
HB163 (Jun,09)	68/M	MFR	Hemocultura	TEM, OXA		CN, TOB, AK, CIP, LVX	<i>tetA</i>	na	+		na
HB166 (Fev,12)	72/F	Cirurgia geral	Urina	TEM		CN, NOR, NA, CIP, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	B2	+		X
HB169 (Jan,12)	66/M	Urologia	Urina	TEM-1, OXA-1(like), CTX-M (15/28)		CN, TOB, NA, NOR, CIP, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>qnrA</i> , <i>tetA</i>	B2	+	PAI, <i>KpsMTK5</i> , <i>traT</i> , <i>yfcV</i>	X
HB170 (Mar,12)	62/F	Consulta-urologia	Urina	OXA		TOB, NA, NOR, CIP	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>tetA</i>	B2	+	<i>traT</i> , <i>yfcV</i>	VIII
HB171 (Mar,12)	25/M	Consulta urologia	Urina	Ø		NA, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	B2	+	PAI, <i>papEF</i> , <i>chuA</i> , <i>KpsMTK5</i> , <i>traT</i> , <i>yfcV</i>	XVI

Legenda: I/S - Idade/Sexo; Fev, 09 - Fevereiro de 2009; Mar, 09 - Março de 2009; Abr, 09 - Abril de 2009; Fev, 12 - Fevereiro de 2012, Mar, 12 - Março de 2012; ^a - zaragatoa cutânea na escara da sacro; AK - amicacina, C - cloranfenicol, CIP - ciprofloxacina, FOS - fosfomicina, CN - gentamicina, LVX - levofloxacina, NET - netilmicina, F - nitrofurantoina, NOR - norfloxacina, TOB - tobramicina, T/S - Trimetoprim/Sulfametoxazol; ♦ - o isolado de *Escherichia coli* não apresenta resistência aos antibióticos testados no equipamento automatizado Vitek e/ou Walkway; Ø - não se detetou amplificação nas reacções de PCR para os genes codificadores de β -lactamases pesquisados: *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} do grupo 1; na - não avaliado.

Tabela 15 (continuação) - Caracterização molecular e relações clonais de isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs responsáveis por infeções do Hospital de Braga

Isolado (Data)	Idade/ Sexo	Serviço	Produto Biológico	Gene da β -lactamase	Resistências Associadas	Genes de resistência a antibióticos não β -lactâmicos	Grupo Filogenético	Grupo clonal O25b-ST131	Fatores de Virulência	PFGE
HB176 (Mar, 12)	38/M	Urgência	Expectoração	TEM + OXA, CTX-M do grupo 1	TOB, CIP, FOS, T/S	<i>aac(6')-lb-cr, tetA</i>	B2	+	<i>chuA, yfcV</i>	I
HB180 (Mar, 12)	76/M	Medicina interna	Urina	TEM	CN, NA	<i>aac(6')-lb-cr</i>	B2	+	<i>KpsMTK5, traT</i>	XXXI
HB184 (Mar, 12)	57/F	Urgência	Urina	CTX-M grupo 1	NA, NOR, CIP, T/S	<i>aac(6')-lb-cr</i>	B2	na	<i>FyuA, chuA, yfcV</i>	XXXVII
HB186 (Fev, 12)	79/F	Medicina interna	Hemocultura	Ø	♦	<i>na</i>	na	na	<i>yfcV</i>	XXXII
HB187 (Fev, 12)	38/M	Urgência	Hemocultura	Ø	♦	<i>na</i>	na	na	<i>FyuA</i>	XXX
HB189 (Jan, 12)	61/F	Oncologia	Urina	TEM + OXA, CTX-M do grupo 1	CN, TOB, NA, NOR, CIP, T/S	<i>aac(6')-lb-cr</i>	B2	+	<i>FyuA, chuA, yfcV</i>	V
HB190 (Fev, 12)	89/F	Medicina interna	Urina	CTX-M grupo 1	CN, TOB, NA, NOR, CIP, T/S	<i>aac(6')-lb-cr; tetA</i>	B2	+	<i>FyuA, chuA, yfcV</i>	VIII
HB191 (Fev, 12)	79/F	Oncologia	Urina	TEM, OXA	CN, TOB, CIP, LVX, T/S	<i>aac(6')-lb-cr, tetA</i>	B2	+	<i>FyuA, chuA, KpsMTK5, yfcV</i>	VIII
HB192 (Fev, 12)	80/F	Medicina interna	Urina	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, NA, NOR, CIP, FOS, T/S	<i>aac(6')-lb-cr</i>	B2	+	<i>PAI, FyuA, chuA, KpsMTK5, yfcV</i>	IV
HB193 (Fev, 12)	78/M	Cirurgia geral	Urina	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, NA, NOR, CIP, T/S	<i>aac(6')-lb-cr, tetA</i>	B2	+	<i>PAI, FyuA, chuA, KpsMTK5, yfcV</i>	VIII
HB194 (Mar, 12)	81/F	Medicina interna	Urina	TEM	CIP, LVX, T/S	<i>aac(6')-lb-cr</i>	B2	+	<i>FyuA, yfcV</i>	XIX
HB195 (Fev, 12)	39/F	Cirurgia geral	Urina	TEM (-1, -104, ...), OXA-1(like), CTX-M grupo 1	TOB, NA, NOR, CIP, FOS, T/S	<i>aac(6')-lb-cr, tetA</i>	B2	+	<i>PAI, FyuA, chuA, KpsMTK5, yfcV</i>	IV
HB196 (Mar, 12)	94/M	Ortopedia	Urina	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, NA, NXN, CIP, T/S	<i>aac(6')-lb-cr, tetA</i>	B2	+	<i>FyuA, chuA, KpsMTK5, yfcV</i>	VIII
HB197 (Jan, 12)	72/M	Consulta urologia	Urina	TEM-1, OXA-1(like), CTX-M 15/28	CN, NA, NOR, CIP, T/S	<i>aac(6')-lb-cr</i>	B2	+	<i>PAI, FyuA, chuA, traT, yfcV</i>	IV
HB199 (Mar, 12)	857M	Urgência	Urina	OXA, CTX-M grupo 1	TOB, NOR, NA, CIP	<i>aac(6')-lb-cr, tetA</i>	B2	+	<i>FyuA, chuA, yfcV</i>	VIII
HB200 (Fev, 12)	24/M	Consulta urologia	Urina	TEM, OXA	F, T/S	<i>aac(6')-lb-cr, tetA</i>	B2	+	<i>FyuA, chuA</i>	na
HB201 (Mar, 12)	47/F	Medicina interna	Pús	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, CIP	<i>aac(6')-lb-cr, tetA</i>	B2	+	<i>PAI, FyuA, chuA, KpsMTK5, traT, yfcV</i>	I
HB204 (Fev, 12)	72/F	Cirurgia geral	Expectoração	CTX-M do grupo 1	TOB, CIP	<i>aac(6')-lb-cr, tetA</i>	B2	+	<i>FyuA, KpsMTK5, yfcV</i>	na

Legenda: I/S - Idade/Sexo; Fev, 09 - Fevereiro de 2009; Mar, 09 - Março de 2009; Abr, 09 - Abril de 2009; Fev, 12 - Fevereiro de 2012; Mar, 12 - Março de 2012; ^a - zaragatoa cutânea na escara da sacro; AK - amicacina, C - cloranfenicol, CIP - ciprofloxacina, FOS - fosfomicina, CN - gentamicina, LVX - levofloxacina, NET - netilmicina, F - nitrofurantoina, NOR - norfloxacina, TOB - tobramicina, T/S - Trimetoprim/Sulfametoxazol; ♦ - o isolado de *Escherichia coli* não apresenta resistência aos antibióticos testados no equipamento automatizado Vitek e/ou Walkway; Ø - não se detetou amplificação nas reacções de PCR para os genes codificadores de β -lactamases pesquisados: *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} do grupo 1; na - não avaliado.

3.6 – Estudo das relações clonais de isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs do estudo de colonização fecal e responsáveis por infeções do hospital de Braga

As relações clonais de isolados de *Escherichia coli* produtora de ESBL de diferentes origens e datas foram estudadas no sentido de explicar possíveis relações entre os isolados desta região do País. As relações clonais foram estudadas em isolados de *Escherichia coli* produtora de ESBL responsáveis por infeções no hospital de Braga e do estudo de colonização fecal realizado a residentes de lares de idosos e de UCCI, da região norte de Portugal. Os perfis de macrorestrição com *Xba*I obtidos por PFGE foram analisados segundo critérios de Tenover e colaboradores (Tenover *et al*, 1995). Isolados com perfis de macrorestrição indistinguíveis em cada gel de PFGE foram selecionados como representativos e analisados através do *software* InfoQuest FP versão 5,4 (Bio-Rad Laboratórios). Na análise dos dendogramas, com o *software* InfoQuest, foram considerados com perfil indistinguível isolados com 100% de similaridade e perfil muito relacionado com $\geq 80\%$ de similaridade.

A Figura 24 apresenta o dendograma dos perfis de macrorestrição com *Xba*I obtidos no PFGE analisados no *software* InfoQuest FP versão 5,4 (Bio-Rad Laboratórios), referente a isolados selecionados de colonização intestinal de residentes de diferentes instituições extra-hospitalares e da unidade hospitalar. Os isolados de *Escherichia coli* produtora de ESBL foram classificados em 38 perfis de PFGE, identificados de I a LVII. A análise do PFGE foi efetuada analisando perfis com similaridade igual ou superior a 80%. Foram identificados dez perfis de PFGE muito relacionados entre si, nomeadamente perfil II (80,3%), perfil IV (85,4%), perfil VI (80,0%), perfil VIII (81,2%), perfil IX (83,3%), perfil XII (81,3%), perfil XIII (82,5%), perfil XIV (91,4%) perfil XX (83,1%), perfil XXII (83,1%) e perfil XXXVIII (88,5%). Os perfis de PFGE identificados com similaridade igual ou superior a 80% apresentam as seguintes características:

- **perfil II:** engloba três isolados de *Escherichia coli* produtora de ESBL com similaridade de 80,3%, provenientes do estudo de colonização fecal. Um isolado foi identificado em 2008 no lar de idosos 5 (LI5-11) do distrito do Porto e dois isolados em 2012 na UCCI 3 (UC3-55 e UC3-73), distrito de Braga. O isolado de *Escherichia coli* do lar de idosos 5 é produtor de TEM, OXA e CTX-M grupo 1 e os isolados da UCCI 3 produtores de TEM-1, OXA-1-like e CTX-M-32. Estes isolados apresentam fenótipo de resistência aos antibióticos não β -lactâmicos que inclui resistência aos aminoglicosídeos,

nomeadamente à tobramicina, às quinolonas como ácido nalidíxico e ciprofloxacina e à tetraciclina, e resistência ao trimetoprim-sulfametoxazol nos dois isolados da UCCI 3. Foram detetados genes codificadores de resistência aos antibióticos não β -lactâmicos nomeadamente *aac(6')-Ib-cr*, *qnrA*, *aac(3)-IV* e *gyrA*. O gene *sul1* foi identificado no isolado LI5-11e no isolado UC3-73. Foram estudados fatores de virulência para o isolado da UCCI 3 e do lar de idosos 5 com identificação do fator de virulência *KpsMT-K5*, comum aos isolados.

- **perfil IV:** este perfil de PFGE inclui vinte isolados de *Escherichia coli* do estudo de colonização fecal a residentes de dois lares de idosos do distrito do Porto e de isolados responsáveis por infeções do hospital de Braga, com similaridade igual ou superior de 85,4%, todos produtores de CTX-M grupo 1. Onze isolados são provenientes do estudo de colonização fecal realizado em 2008 de residentes do lar de idosos 5 e um isolado do lar de idosos 6, distrito Porto, e os restantes isolados responsáveis por infeções do hospital de Braga, identificados em 2012 e em 2009. Os isolados de *Escherichia coli* do hospital de Braga foram isolados, na sua maioria em amostras de urina, provenientes de serviços diferentes, nomeadamente medicina interna, cirurgia geral, ortopedia e urologia. O genótipo *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA} e *bla*_{CTX-M grupo 1} é predominante nos isolados de *Escherichia coli* deste perfil, com exceção de dois isolados, um do lar de idosos 6 produtor de OXA e CTX-M grupo 1 e um isolado do lar de idosos 5 produtor de CTX-M grupo 1. Em relação ao fenótipo de resistências associadas aos antibióticos não β -lactâmicos, apresentam perfil semelhante que caracteriza-se pela resistência aos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e tetraciclina. Todos os isolados deste perfil, com exceção do isolado do lar de idosos 6 amplificaram para o gene *aac(6')-Ib-cr*. Isolados deste perfil apresentam algumas diferenças inerentes a genes que codificam resistência aos antibióticos não β -lactâmicos e genes de virulência.

- **perfil VI:** inclui dois isolados identificados em 2012, um no estudo de colonização fecal na UCCI 3 e um isolado responsável por infeção do hospital de Braga, com similaridade de 80,0%. O doente da UCCI 3 admitido na unidade de cuidados continuados referenciado da USF da área de residência (domicílio), não apresenta história de internamento no hospital de Braga, no processo clínico. O isolado responsável por infeção foi identificado numa amostra de expectoração, de um doente internado no serviço de medicina interna. Os isolados produtores de TEM, OXA e CTX-M grupo 1, apresentam características comuns como resistência aos aminoglicosídeos e trimetoprim-sulfametoxazol e gene *aac(6')-Ib-cr*.

- **perfil VIII:** este perfil inclui 12 isolados de *Escherichia coli* produtores de TEM, OXA e CTX-M grupo 1 provenientes do estudo de colonização fecal e isolados

responsáveis por infecções, com similaridade igual ou superior de 85,4%. Os isolados são produtores de CTX-M grupo 1 exceto o isolado UC1-10 produtor de TEM. Neste perfil estão incluídos isolados do estudo de colonização fecal do lar de idosos 6, distrito do Porto e da UCCI 3, distrito de Braga. Em relação aos isolados reponsáveis por infecções são provenientes de diferentes serviços da unidade hospitalar, mas todos identificados em amostras de urina. Os isolados deste perfil apresentam em comum resistência aos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas e o gene *aac(6')-Ib-cr*.

- **perfil XIII:** inclui cinco isolados de *Escherichia coli* do estudo de colonização fecal correspondente a um doente da UCCI 1 e quatro doentes da UCCI 3, com similaridade de 82,5%. Os isolados de *Escherichia coli* são produtores de TEM, OXA e CTX-M grupo 1, exceto o isolado UC3-57 produtor de TEM e CTX-M grupo 1. Sequenciação de isolados representativos deste perfil correspondente ao isolado da UCCI (UC1-13) e da UCCI 3 (UC3-53) revela presença de TEM-1, OXA-1-like e CTX-M 15 ou CTX-M 28. Os isolados apresentam diferenças no perfil de resistência aos antibióticos não β -lactâmicos, no entanto os cinco isolados são resistentes à estreptomicina, ciprofloxacina, tetraciclina e trimetoprim-sulfametoxazol. Adicionalmente, quatro isolados são resistentes ao ácido nalidíxico com exceção do isolado UC3-88, dois isolados da mesma instituição apresentam resistência à gentamicina e tobramicina (UC3-53 e UC3-60) e um isolado (UC3-88) é resistente ao cloranfenicol. Os isolados produtores de CTX-M do grupo 1 apresentam o gene *aac(6')-Ib-cr* que poderá explicar a resistência associada dos isolados à ciprofloxacina, no entanto apresentam diferenças em relação aos restantes. O fator PAI e os genes *fimH* e *chuA* são comuns aos cinco isolados apresentando algumas diferenças em relação a outros genes pesquisados.

- **perfil XX:** composto por três isolados produtores de CTX-M grupo 1 do estudo de colonização fecal provenientes de instituições diferentes: lar de idosos 5, 6 e UCCI 1. Os isolados são resistentes aos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina e trimetoprim-sulfametoxazol.

- **perfil XXII:** abrange 10 isolados de *Escherichia coli* produtores de CTX-M grupo 1 provenientes do estudo de colonização fecal no lar de idosos 5 (distrito Porto) de 2008, UCCI 1 e UCCI 2 em 2009 (distrito Braga) e UCCI 3 em 2012 (distrito Braga), e isolados responsáveis por infecções do hospital de Braga de 2009. Os quatro isolados responsáveis por infecções da unidade hospitalar foram isolados nos serviços de urgência, MFR, consulta externa de MFR e serviço de medicina interna. Na sua maioria, associado à presença do gene *bla*_{CTX-M grupo 1}, apresentam o gene *bla*_{TEM} e *bla*_{OXA}. O perfil de resistência aos antibióticos não β -lactâmicos e virulência, como nos perfis anteriores evidencia algumas diferenças. No entanto caracterizam-se pela resistência à

ciprofloxacina (exceto o isolado HB4) e aminoglicosídeos como gentamicina e tobramicina. Os isolados apresentam o gene *acc(6')-lb-cr*, *qnrA*, *tetA* e *sul1* na sua maioria, assim como o perfil de virulência PAI, *chuA*, *KpsMT-K5*, *fimH*, *traT* e *FyuA*.

Os perfis XII e XXXVIII são os perfis de PFGE com menor representação, cada um com dois isolados, um correspondente a um isolado do estudo de colonização fecal e um isolado responsável por infecção do hospital de Braga, no primeiro identificado em 2009 e no segundo perfil, correspondente a 2012.

Os isolados de *Escherichia coli* produtora de ESBL identificados nos dez perfis de PFGE, são do grupo filogenético B2 e do grupo clonal O25b-ST131, detetados por PCR. O perfil de genes que codificam fatores de virulência evidencia que apresentam na sua maioria os genes PAI, *traT*, *fimH*, *KpsMT-K5*, *chuA*, *fyuA* e *yfcV*, existindo algumas diferenças dentro de cada perfil de PFGE. Os isolados de *Escherichia coli* produtora de ESBL dos dez perfis de PFGE identificados, com similaridade igual ou superior a 80%, apresentam características semelhantes ao nível do perfil de resistência aos antibióticos não β -lactâmicos, que inclui maioritariamente resistência aos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina e trimetoprim-sulfametoxazol. Estes resultados corroboram a pesquisa de genes codificadores de resistência a estes antibióticos, com deteção relevante do gene *aac(6')-lb-cr*, *qnrA*, *aac(3)-IV*, *gyrA* e *sul1*.

Os isolados de *Escherichia coli* produtora de ESBL são na sua maioria produtores de TEM, OXA e CTX-M grupo 1, com possibilidade de CTX-M-15 do grupo filogenético virulento B2 e do grupo clonal O25b-ST131. As características evidenciadas em relação ao perfil de resistência aos antibióticos não β -lactâmicos e genes de resistência pesquisados, perfil de genes codificadores de fatores de virulência, grupo filogenético B2 e deteção por PCR do grupo clonal O25b-ST131 em todos os isolados de *Escherichia coli* analisados por PFGE, leva-nos a pensar tratar-se do mesmo grupo clonal. A análise de perfis PFGE relacionados a $\geq 60\%$ evidencia que os isolados dez perfis de PFGE e outros isolados não incluídos nos referidos perfis, se encontram relacionados entre si, evidenciando características comuns, como presença do gene *bla*_{CTX-M grupo 1}, resistência aos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, gene *acc(6')-lb-cr*, grupo filogenético B2, perfil similar de genes de virulência e amplificação por PCR para pesquisa do grupo clonal O25b-ST131.

Isolado	Data	Produto	Instituição/Serviço	β-lactamase	Grupo Clonal O25b-ST131*	Grupo Filogenético	Resistências associadas	Genes de resistência	Fatores de Virulência	Perfil de PFGE
HB201 ^a	2012	Pus	Medicina Interna	CTX-M grupo 1	+	B2	TOB, CIP	<i>aac(6')-Ib-cr, tetA</i>	<i>fyuA, kpsMT-K5, yjcV</i>	I
UC1-19	2009	Colonização	UCCI 1	***	-	D	S, NA, TE, C, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
U5-11	2008	Colonização	Lar de Idosos	TEM	+	na	CN, TOB, NA, CIP, TE	<i>aac(6')-Ib-cr, gyrA, sul1</i>	<i>fyuA, KpsMT-K5, vat</i>	II
UC3-55	2012	Colonização	UCCI 3	TEM-1, OXA-1-IIIe, CTX-M-32	+	B2	S, TOB, NA, CIP, TE, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IV, qnrA, gyrA</i>	<i>afidraoBC, fimH, fyuA, chuA, KpsMT-K5, traT, yjcV</i>	
UC3-73	2012	Colonização	UCCI 3	TEM	+	B2	S, NA, CIP, TE, C	<i>aac(6')-Ib-cr, qnrA, gyrA, sul1</i>		
HB27	2009	Urina	MFR	OXA-1-IIIe, CTX-M15/28	+	B2	CN, TOB, NOR, CIP, LVX, TE, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>PAL, papaleili, fyuA, chuA, KpsMT-K5, traT</i>	III
HB192	2012	Urina	Medicina interna	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	+	B2	CN, TOB, NOR, NA, CIP, T/S, FOS	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>PAL, fyuA, chuA, KpsMT-K5, yjcV</i>	
U5-33 ^b	2008	Colonização	Lar de idosos 5	TEM-1, OXA-1-IIIe, CTX-M15/28	+	B2	CN, TOB, NA, CIP, TE	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IV, gyrA, qnrA, tetA, sul1, traT, yjcV</i>	<i>PAL, afidraoBC, fimH, cat, fyuA, chuA, KpsMT-K5, traT, yjcV</i>	
U5-34	2008	Colonização	Lar de Idosos 5	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	na	B2	CN, TOB, AK, NA, CIP, TE	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IV, qnrA, gyrA, sul1</i>	<i>PAL, afidraoBC, fimH, cat, traT, fyuA, chuA, KpsMT-K5, yjcV</i>	
HB90	2009	Urina	Neurologia	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	+	B2	CN, TOB, NOR, NA, CIP, LVX, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr, tetA</i>	<i>PAL, chuA, KpsMT-K5, traT, yjcV</i>	
HB195 ^c	2012	Urina	Cirurgia geral	TEM-1-104, OXA-1-IIIe, CTX-M 15/28	+	B2	TOB, NOR, NA, CIP, FOS, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr, tetA</i>	<i>PAL, fyuA, chuA, KpsMT-K5, yjcV</i>	IV
U6-7	2008	Colonização	Lar de idosos 6	OXA-1-IIIe, CTX-M 15/28	+	B2	CN, TOB, NA, CIP, TE, T/S, F	<i>aac(6')-Ib-cr, tetA, qnrA</i>	<i>PAL, fimH, traT</i>	
U5-42 ^d	2008	Colonização	Lar de idosos 5	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	+	B2	S, CN, TOB, NA, CIP, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr, qnrA, tetA, aac(3)-IV, gyrA</i>	<i>PAL, fyuA, chuA, KpsMT-K5, fimH, traT, vat</i>	
U5-42	2008	Colonização	Lar de idosos 5	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	+	B2	S, CN, TOB, NA, CIP, TE, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr, gyrA, sul1</i>	<i>PAL, fimH, traT, KpsMT-K5</i>	
U5-43 ^e	2008	Colonização	Lar de idosos 5	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	+	B2	CN, TOB, NA, NOR, CIP, LVX, T/S, FOS	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>chuA, yjcV</i>	
U5-26	2008	Colonização	Lar de Idosos 5	CTX-M grupo 1	+	B2	CN, TOB, NET, NA, CIP, TE, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr, qnrA, aac(3)-IV, gyrA, sul1</i>	<i>PAL, fimH, KpsMT-K5, chuA, vat, yjcV</i>	V
HB189	2012	Urina	Oncologia	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	+	B2	CN, TOB, NA, NOR, CIP, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>fyuA, chuA, yjcV</i>	
UC3-47	2012	Colonização	UCCI 3	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	+	B2	CN, TOB, NA, NOR, CIP, LVX, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>fyuA, chuA, yjcV</i>	VI
HB176	2012	Exspetoração	Urgência	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	+	B2	TOB, CIP, FOS, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr, tetA</i>	<i>chuA, yjcV</i>	
•										
U7-48	2009	Colonização	Lar de idosos 7	TEM-1, OXA-1-IIIe, CTX-M15/28	+	B2	S, CN, TOB, NA, CP, TE, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr, tetA, sul1</i>	<i>fyuA, chuA, yjcV</i>	VII
HB169 ^f	2012	Urina	Urologia	TEM-1, OXA-1-IIIe, CTX-M15/28	+	B2	CN, TOB, NA, NOR, CIP, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr, qnrA, tetA</i>	<i>PAL, KpsMT-K5, traT, yjcV</i>	
UC1-10	2009	Colonização	UCCI 1	TEM	-	D	TE	<i>gyrA, sul1</i>	<i>PAL, fimH, fyuA, chuA, KpsMT-K5, traT, vat, yjcV</i>	
U6-38	2008	Colonização	Lar de idosos 6	TEM-1, OXA-1-IIIe, CTX-M15/28	na	B2	S, TOB, NET, NA, CIP, T/S, TE, C	<i>aac(6')-Ib-cr, qnrA, sul1</i>	na	
UC3-67	2012	Colonização	UCCI 3	TEM, CTX-M-32	na	B2	CN, TOB, NOR, CIP, LVX, TE, T/S, F	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>PAL, KpsMT-K5</i>	VIII
HB119	2012	Urina	MFR	CTX-M grupo 1	na	B2	CN, TOB, NOR, NA, CIP, LVX, FOS, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>cat, KpsMT-K5, traT, yjcV</i>	
HB122 ^h	2012	Urina	MFR	TEM-1-104, OXA-1-IIIe, CTX-M15/28	+	B2	CN, TOB, NOR, NA, CIP, LVX, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr, tetA</i>	<i>PAL, papaleili, cat, chuA, KpsMT-K5, traT, yjcV</i>	
HB170 ⁱ	2012	Urina	Consulta Urologia	OXA	+	B2	CN, NOR, CIP, LVX, TE, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr, tetA</i>	<i>traT, yjcV</i>	
UC3-75	2012	Colonização	UCCI 3	OXA-1-IIIe, CTX-M-35/28	+	B2	TOB, S, C, CIP, NA	<i>aac(6')-Ib-cr, qnrA, sul1, aac(3)-IV</i>	<i>fyuA, yjcV</i>	
HB79	2012	Urina	MFR	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	na	B2	CN, TOB, NOR, CIP, LVX, TE, T/S	<i>tetA</i>	<i>PAL, KpsMT-K5, traT, yjcV</i>	IX
HB117	2009	Urina	Medicina interna	OXA-1-IIIe, CTX-M15/28	+	B2	CN, TOB, NOR, NA, CIP, LVX, FOS, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>PAL, KpsMT-K5</i>	
HB166	2012	Urina	Cirurgia geral	TEM	na	na	TOB, NOR, NA, CIP, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>fyuA</i>	X
•										
UC1-16	2009	Colonização	UCCI 1	TEM	-	D	NA, CIP, TE, T/S, C	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>KpsMT-K5, traT</i>	XI
UC2-2	2009	Colonização	UCCI 2	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	+	B2	TOB, NA, CIP, TE, T/S, C, F	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>fyuA, chuA</i>	XII
•										
HB144	2012	Urina	Hospital de Dia	TEM	+	B2	CN, TE, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>KpsMT-K5, traT</i>	XIII
UC3-53	2012	Colonização	UCCI 3	TEM-1, OXA-1-IIIe, CTX-M grupo 15/28	+	B2	CN, NA, CIP, TE	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IV, gyrA</i>	<i>PAL, fimH, papEF, fyuA, traT</i>	
UC3-88	2012	Colonização	UCCI 3	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	+	B2	TOB, NA	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IV, gyrA</i>	<i>PAL, fimH</i>	
UC1-13	2009	Colonização	UCCI 1	TEM-1, OXA-1-IIIe, CTX-M15/28	+	B2	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IV, qnrA, gyrA, tetA, sul1</i>	<i>PAL, fimH, chuA, KpsMT-K5, traT</i>		
UC3-57	2012	Colonização	UCCI 3	TEM, CTX-M grupo 1	na	B1		<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>fyuA</i>	
UC3-60	2012	Colonização	UCCI 3	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	+	B2	S, CN, TOB, NA, CIP, TE, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr, qnrA</i>	<i>PAL, fimH, fyuA, chuA, traT, yjcV</i>	
•										
HB27	2009	Urina	MFR	OXA-1-IIIe, CTX-M15/28	+	B2	CN, TOB, LVX, NOR, TE, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>PAL, papaleili, fyuA, chuA, KpsMT-K5, traT</i>	XIV
HB79	2009	Urina	Cirurgia Plástica	CTX-M grupo 1	+	B2	NA, NOR, CIP, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>fyuA, chuA, yjcV</i>	XV
HB171	2012	Urina	Consulta Urologia	***	na	B2	NA, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>PAL, papEF, fyuA, KpsMT-K5, traT, yjcV</i>	
U6-17	2008	Colonização	Lar de idosos 6	TEM	-	na	S, NA, NET			XVI

Figura 24 - Relação clonal e resumo dos resultados dos isolados de *Escherichia coli* do estudo de colonização fecal realizado a utentes de lares de idosos e de UCCI, e isolados de infeções do hospital de Braga. Legenda: Perfil de macrorestrição de DNA total de isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs com *Xba*I e analisados no *software* Infocuest! FP versão 5.4 (Bio-Rad Laboratórios). A percentagem de similaridade dos isolados foi calculada pela aplicação do método de grupo ponderada de par com ligações médias (UPGMA) algoritmo com base no coeficiente de similaridade de Dice (1,5% de omissão; 1,5% de tolerância). * deteção rápida por PCR do grupo clonal O25b-ST131 segundo Clermont e colaboradores (Clermont *et al*, 2009); isolados com perfil indistinguível: a - isolado H176; b - isolado U5-39, U5-38; c - isolado HB197, d - U5-39, U5-38; e - U5-41, f - HB190, HB193, HB196, h - HB130, U6-34, i - HB199; (***) - não se verificou amplificação dos genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M do grupo 1}*; e *bla_{OXA}*; Resistência aos antibióticos não β-lactâmicos: S - estreptomicina, CN - gentamicina, AK - amicacina, NET - netilmicina, NA - ácido nalidíxico, NOR - norfloxacina, CIP - ciprofloxacina, LVX - levofloxacina, F - nitrofurantoina, C - cloranfenicol, FOS - fosfomicina, T/S - Trimetoprim/Sulfametoxazol; na - não avaliado; • não apresenta resistências aos antibióticos não β-lactâmicos estudados.

Isolado	Data	Amostra	Instituição /Serviço	β-lactamase	Grupo clonal O25b-ST131*	Grupo Filogenético	Resistências associadas	Genes de resistência	Fatores de Virulência	Perfil de PFGE
HB171	2012	Urina	Urologia-consulta	***	+	B2	NA, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>PAI, kpsMTIII-K5, traT, chuA, fyuV</i>	XVII
LI6-17	2008	Colonização	Lar de idosos 6	TEM	-	D	S, NET, NA	<i>aac(3)-IV, gyrA</i>	<i>PAI, fimH, traT, VAT, kpsM-K5, oif, fyuV</i>	XVIII
HB79	2009	Urina	MFR	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	+	B2	CN, TOB, NOR, NA, CIP, LVX, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr, qnrA</i>	<i>PAI, traT</i>	
*					+					
HB194	2012	Urina	Medicina interna	TEM	+	B2	CIP, LVX, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>FyuA, yfuV</i>	XIX
LI5-8	2008	Colonização	Lar de idosos 5	CTX-M grupo 1	+	B2	CN, TOB, AK, NA, CIP, TE	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IV, qnrA, gyrA, tetA, sul1</i>	<i>PAI, fimH, fyuA, traT, chuA, yfuV</i>	
UC2-11	2009	Colonização	UCU 2	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	+	B2	S, TOB, NET, NA, CIP, TE, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr, qnrA, aac(3)-IV, gyrA, sul1</i>	<i>kpsMT-K5, chuA, yfuV, fyuA</i>	XX
LI6-19	2008	Colonização	Lar de idosos 6	OXA, CTX-M grupo 1	na	B2	CN, TOB, NA, CIP, TE	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IV, gyrA, qnrA, tetA</i>	<i>PAI, fyuA, chuA, yfuV, traT, fimH</i>	
UC3-52	2012	Colonização	UCU 3	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	+	B2	TOB, NA, CIP, C	<i>aac(6')-Ib-cr, qnrA, gyrA</i>	<i>PAI, anofa, fimH, traT, yfuV, chuA, fyuA</i>	XXI
HB66	2009	Urina	Urgência	TEM(1-1,304), OXA-1-like, CTX-M15/28	+	B2	CN, TOB, NOR, CIP, LVX, TE, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr, qnrA, tetA</i>	<i>PAI, kpsMT-K5, chuA, yfuV, FyuA</i>	
UC3-53	2012	Colonização	UCU 3	TEM-1, OXA-1-like, CTX-M 15/28	+	B2	S, CN, TOB, NA, CIP, TE, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr, tetA, qnrA, gyrA</i>	<i>PAI, kpsMT-K5, fimH, yfuV, chuA, fyuA</i>	
UC1-7	2009	Colonização	UCU 1	OXA, CTX-M grupo 1	+	B2	CN, TOB, NA, CIP, TE, T/S, F	<i>aac(6')-Ib-cr, tetA, qnrA</i>	<i>PAI, fimH, traT</i>	
UC3-49	2012	Colonização	UCU 3	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	+	B2	S, CN, TOB, NA, CIP, S/T	<i>aac(6')-Ib-cr, qnrA, tetA, aac(3)-IV, gyrA</i>	<i>PAI, kpsMT-K5, fimH, traT, chuA, VAT, fyuA</i>	IV
UC1-2	2009	Colonização	UCU 1	TEM-1, OXA-1-like, CTX-M 15/28	+	B2	S, CN, TOB, NA, CIP, TE, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr, gyrA, sul1</i>	<i>PAI, fimH, traT, kpsMT-K5</i>	XXII
HB63	2009	Urina	MFR	OXA, CTX-M grupo 1	+	B2	CN, TOB, NA, NOR, CIP, LVX, T/S, FOS	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>chuA, yfuV</i>	
UC1-11	2009	Colonização	UCU 1	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	+	B2	CN, TOB, NET, NA, CIP, TE, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr, qnrA, aac(3)-IV, gyrA, sul1</i>	<i>PAI, fimH, kpsMT-K5, chuA, VAT, fyuV</i>	
HB4	2009	Expetoração	Medicina interna	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	+	B2	CN, TOB, LVX	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>PAI, kpsMT-K5, traT, chuA, fyuA</i>	
HB55	2009	Urina	MFR-consulta	OXA, CTX-M grupo 1	+	B2	CN, TOB, NA, NOR, CIP, LVX, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>chuA, fyuV, fyuA</i>	
HB111	2009	Urina	Medicina interna	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	+	B2	CN, TOB, NOR, CIP, LVX, TE, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr, qnrA</i>	<i>PAI, kpsMT-K5, fyuV</i>	
HB52	2009	Hemocultura	Cirurgia	OXA, CTX-M grupo 1	+	B2	TOB, NOR, CIP, LVX, TE	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>finH, papEF, chuA, yfuV, fyuA</i>	XXIII
UC2-12	2009	Colonização	UCU 2	TEM-1, OXA-1-like, CTX-M 15/28	+	B2	S, CN, TO, NA, CP, TE, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr, tetA, sul1</i>	<i>yfuV, chuA, fyuA</i>	XXIV
*										
LI5-18	2008	Colonização	Lar de idosos 5	TEM	-	D	TE	<i>gyrA, sul1</i>	<i>PAI, fimH, fyuA, chuA, VAT, yfuV, kpsMT-K5, traT</i>	XXV
UC1-12	2009	Colonização	UCU 1	TEM-1, OXA-1-like, CTX-M 15/28	+	B2	S, TOB, NET, NA, CIP, T/S, TE, C	<i>aac(6')-Ib-cr, qnrA, sul1</i>	na	
HB25	2009	Urina	Medicina interna	TEM, SHV	na	B2	CN, TOB, NOR, CIP, LVX, TE, T/S, F	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>PAI, kpsMT-K5</i>	XXVI
UC3-70	2012	Colonização	UCU 3	TEM, CTX-M grupo 1	na	B2	S, CN, NA, CIP, TE, T/S			XXVII
*										
HB18	2009	Urina	Urgência	TEM, CTX-M grupo 1	+	B2	CN, NOR, CIP, LVX, TE, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>PAI, kpsMT-K5, traT, chuA, fyuA</i>	XXVIII
*										
HB105	2009	Urina	Medicina interna	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	na	B2	CN, TOB, NOR, CIP, LVX, TE, T/S	<i>tetA</i>	<i>PAI, kpsMT-K5, traT, fyuV</i>	XXIX
*										
HB187	2012	Hemocultura	Urgência	***	na	na	•	na	<i>fyuA</i>	XXX
ni										
HB180	2012	Urina	Medicina interna	TEM	+	B2	NA, CIP	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>kpsMT-K5, traT</i>	XXXI
*										
HB186	2012	Hemocultura	Medicina interna	***	na	na	•		<i>yfuV</i>	XXXII
ni										
LI5-4	2008	Colonização	Lar de idosos 5	TEM, CTX-M grupo 1	+	B2	CN, NA, CIP, TE	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IV, gyrA</i>	<i>PAI, fimH, papEF, fyuA, traT</i>	XXXIII
LI7-1	2008	Colonização	Lar de idosos 7	***	na	na	TOB, NA	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IV, gyrA</i>	<i>PAI, fimH</i>	XXXIV
*										
HB42	2009	Liq. peritoneal	MFR-consulta	CTX-M grupo 1	na	B1	•	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>chuA, fyuA</i>	XXXV
*										
UC3-44	2012	Colonização	UCU 3	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	+	B2	CN, CIP, TOB	<i>aac(6')-Ib-cr, tetA</i>		XXXVI
*										
HB184	2012	Urina	Urgência	CTX-M grupo 1	na	B2	NA, NOR, CIP, T/S	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>chuA, fyuA, yfuV</i>	XXXVII
ni										
LI5-51	2008	Colonização	Lar de idosos 5	OXA	na	B2	S, CN, TOB, NA, CP, TE, C	<i>aac(6')-Ib-cr, gyrA</i>	<i>PAI, fimH, kpsMT-K5, traT, fyuA</i>	XXXVIII
HB132	2009	Urina	Urologia - consulta		+	B2			<i>chuA, yfuV</i>	

Figura 24. - Relação clonal e resumo dos resultados dos isolados de *Escherichia coli* do estudo de colonização fecal realizado a utentes de lares de idosos e de UCCI, e isolados de infeções do hospital de Braga. Legenda: Perfil de macrorestrição de DNA total de isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs com *XbaI* e analisados no *software* InfoQuest FP versão 5.4 (Bio-Rad Laboratórios). A percentagem de similaridade dos isolados foi calculada pela aplicação do método de grupo, ponderada de par com ligações médias (UPGMA) algoritmo com base no coeficiente de similaridade de Dice (1.5% de eliminação; 1.5% de tolerância). * - deteção rápida por PCR do grupo clonal O25b-ST131 segundo Clermont e colaboradores (Clermont *et al.* 2009); Isolados com perfil indistinguível: a - isolado H176; b - isolado LI5-17, LI6-18; c - isolado H191, H193, H196; h - HB130, LI6-34, i - HB199; --- - não se verificou amplificação dos genes *bla*^{TEM-1}, *bla*^{SHV}, *bla*^{CTX-M do grupo 1} e *bla*_{OXA}. Resistência aos antibióticos não β-lactâmicos: S - estreptomicina, CN - gentamicina, TOB - tobramicina, AK - amicacina, NET - netilmicina, NA - ácido nalidíxico, NOR - norfloxacina, CIP - ciprofloxacina, LVX - levofloxacina, F - cloranfenicol, T/S - Trimetoprim/Sulfametoxazol; na - não avaliado; • não apresenta resistências aos antibióticos não β-lactâmicos estudados.

4 – Caracterização molecular de isolados de *Klebsiella pneumoniae* do estudo de colonização fecal e responsáveis por infeções do hospital de Braga

A caracterização molecular de isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL do estudo de colonização fecal a residentes de lares de idosos e de UCCI da região norte de Portugal e isolados responsáveis por infeções provenientes do hospital de Braga foi dirigido para o estudo das principais famílias das ESBLs, da classe A para deteção dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M grupo 1} e da família D, *bla*_{OXA}.

Os resultados da deteção de genes codificadores de β -lactamases nos isolados de *Klebsiella pneumoniae* provenientes do estudo de colonização a residentes de lares de idosos e de UCCI são apresentados na Tabela 16 e responsáveis por infeções do hospital de Braga na Tabela 17. A pesquisa dos genes *bla* permitiu detetar 24 genes *bla*_{TEM}, 3 genes *bla*_{SHV}, 22 *bla*_{OXA} e 26 *bla*_{CTX-M grupo 1}. A pesquisa dos genes *bla*_{CTX-M grupo 1} foi o predominante, isolado ou em conjunto com os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA} e/ou *bla*_{SHV} nos isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs provenientes das diferentes instituições (Figura 25). Conjuntos de isolados com perfis genotípicos que incluíam apenas um gene *bla*, nomeadamente *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M grupo 1} foram identificados em isolados de *Klebsiella pneumoniae*. A Figura 25 evidencia o perfil predominante, TEM, OXA e CTX-M grupo 1 identificado em 13 isolados de *Klebsiella pneumoniae* das diferentes instituições. O gene *bla*_{SHV} foi detetado em dois isolados responsáveis por infeções do hospital de Braga associado ao gene *bla*_{TEM} e associado aos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA} e *bla*_{CTX-M grupo 1} e num isolado da UCCI 1.

Isolados representativos de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs provenientes do lar de idosos 7, da UCCI 1 e UCCI 3 e do hospital de Braga foram selecionados para sequenciação dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M grupo 1} e *bla*_{OXA} atendendo ao fenótipo característico da produção de ESBLs apresentado na avaliação fenotípica de suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos. Foram selecionados cinco isolados para sequenciação dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{OXA}, atendendo ao fenótipo característico da produção de ESBLs. O gene *bla*_{TEM-1} (n=2) foi identificado nos isolados da UCCI 1, no entanto o resultado da sequenciação do gene *bla*_{TEM}, em dois isolados do lar de idosos 7 e num isolado responsável por infeção do hospital de Braga, demonstra possibilidade de diferentes variantes, como TEM-1, TEM-104 ou outras variantes TEM. O gene *bla*_{OXA-1-like} (n=3) foi identificado nos isolados sequenciados provenientes do lar de idosos 7 e UCCI 1. O gene *bla*_{CTX-M15} ou 28 foi identificado nos isolados estudados do lar

de idosos 7, UCCI 1 e isolados responsáveis por infeções do hospital de Braga, com possibilidade de CTX-M-15, merecendo estudo futuro para diferenciação da β -lactamase CTX-M.

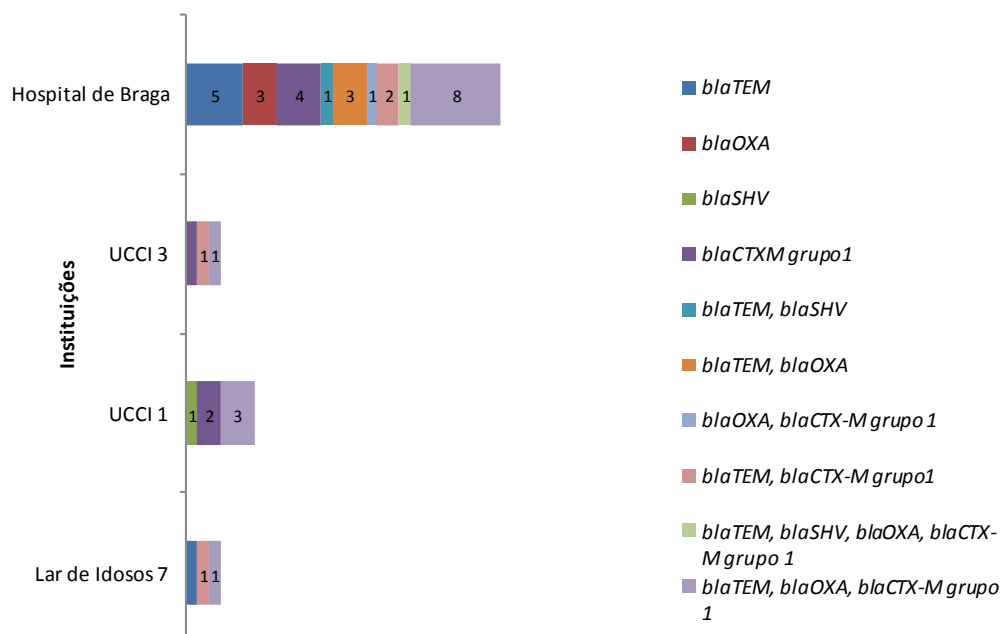


Figura 25 - Distribuição dos genótipos de β -lactamases detetados nos isolados de *Klebsiella pneumoniae* do estudo de colonização fecal e responsáveis por infeções do hospital de Braga

Tabela 16 - Caracterização molecular dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL do estudo de colonização fecal em utentes de lares de idosos e de UCCI

Instituição	Amostra	Isolado	MS	I/S	β-lactamases	Resistências associadas	PFGE
Lar de Idosos 7	3	LI7-3	CTX	s/i	TEM	TOB, NA, CIP	na
	6	LI7-6	ATM	s/i	TEM (-1, -104,...), OXA-1(like), CTX-M-15/28	CN, TOB, NET, F, T/S, NA, CIP, TE	XXXII
	38	LI7-38	ATM	s/i	TEM (-1,-104,...), CTX-M grupo 1	♦	XXV
UCCI 1	1	UC1-23	CAZ	50,M	TEM-1, OXA-1(like), CTX-M 15/28	S, CN, TOB, NET, F, NA, CIP, TE	XXXII
	2	UC1-37	CAZ	67,F	TEM-1, OXA-1 (like), CTX-M 15/28	TOB, F	XXIII
	4	UC1-19	CAZ	84,F	SHV	S, F, T/S, NA,C, TE	XXXV
	5	UC1-16	ATM	74,F	CTX-M grupo 1	TOB, F	VIII
	6	UC1-33	CAZ	57,F	CTX-M grupo 1	TOB, F	XII
	7	UC1-18	CTX	52,M	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	TOB, F	XV
	14	UC1-108	CTX	52,M	Ø	S, CN, TOB, NET, F, T/S, NA, CIP, C, TE	na
	35	UC3-41 (MDR)	CAZ	78,M	TEM, CTX-M grupo 1	S, CN, T/S, NA, CIP, TE	XXIX
UCCI 3	27	UC3-64 (MDR)	CAZ	82,F	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	S, T/S, NA, CIP, TE	na
	34	UC3-44 (LDM)	CAZ	80,F	CTX-M grupo 1	F, T/S, CIP, C, TE	na

Legenda: I/S - idade/sexo; s.i. - sem informação; (...) outras variantes da β-lactamase; na - não avaliado; *** - não foram detetados os genes *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M do grupo 1 e *bla*OXA; na - não avaliado PFGE; C - cloranfenicol, CIP - ciprofloxacina, FOS - fosfomicina, CN - gentamicina, LVX - levofloxacina, NET - netilmicina, F - nitrofurantoína, NOR - norfloxacina, P/T - piperacilina/tazobactam, TI - ticarcilina, TI/CLAV - ticarcilina/ácido clavulânico, TOB - tobramicina, T/S - trimetoprim/sulfametoxazol, TIG - tigeciclina, PI/CLAV - piperacilina/ácido clavulânico, PI - Piperacilina, TE - tetraciclina; ♦ - o isolado não é resistente aos antibióticos testados no teste de suscetibilidade aos antibióticos; Ø - não foram amplificados nas reações de PCR genes codificadores das β-lactamases: *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*OXA e *bla*CTX-M do grupo 1

Tabela 17 - Caracterização molecular dos isolados responsáveis por infeções de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL do hospital de Braga

Isolado (Data)	Idade/Sexo	Proveniência	Serviço	Produto Biológico	β -lactamases	Resistências associadas aos antibióticos não β -lactâmicos	PFGE
HB 30 (Mar, 09)	59/ F	Dc	Urgência	Zaragatoa cutânea*	TEM + SHV	CN, NOR, CIP, LVX, TE, T/S	XXII
HB 41 (Mar, 09)	72/M	Dc	MFR	Urina	OXA	TOB, NOR, CIP, LVX, T/S, F	XXVI
HB 50 (Mar, 09)	58/M	Dc	Neurocirurgia	Urina	TEM, SHV, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, AK, NOR, TE, T/S	na
HB 51 (Mar, 09)	58/M	Δ	Neurocirurgia	Urina	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, TE, T/S, F	na
HB 71 (Mar, 09)	34/F	Dc	Urgência	Urina	OXA	CN, TOB, NOR, CP, LVX, T/S, FOS	na
HB 92 (Mai, 09)	43/M	Dc	MFR	Urina	CN	GM, TOB, CIP, T/S	I
HB 97 (Mai, 09)	47/M	Dc	Neurocirurgia	Exsudado uretral	TEM	TOB, LVX, CIP	na
HB 101 (Jun, 09)	76/F	Dc	MFR	Urina	TEM, CTX-M grupo 1	TOB, NOR, CIP, LVX, FD, FOS	na
HB 102 (Abr, 09)	43/M	Dc	MFR	Urina	TEM	TOB, NOR, LVX, F	II
HB 104 (Mar, 09)	43/M	Dc	MFR	Urina	OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, T/S	XIX
HB 137 (Jun, 09)	76/F	Dc(ac)	Urgência	Urina	CTX-M grupo 1	TOB, NOR, CIP, LVX, F	XXI
HB 149 (Mar, 09)	70/M	Dc	MFR	Urina	***		na
HB 162 (Mar, 12)	68/M	Dc	Urgência	Urina	TEM	CN, TOB, NOR, CIP, T/S	XX
HB 164 (Jan, 12)	28/M	Dc	Consulta urologia	Urina	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, T/S	IV

Legenda: (...) outras variantes da β -lactamase; na - não avaliado; Δ - transferido de um hospital do distrito de Braga para o Hospital de Braga, residente no domicílio; \diamond - transferido de um hospital do distrito do Porto para o Hospital de Braga, residente de uma UCCI no distrito de Braga; zaragatoa cutânea* - zaragatoa cutânea na escara na sacro; *** - não amplificou para os genes pesquisados no estudo *bla*TEM, *bla*OXA, *bla*SHV e *bla*CTX-M grupo 1; AK - amicacina, AUG - amoxicilina com ácido clavulânico, AM - ampicilina, CFZ - cefazolina, CPE - cefepime, CFT - Cefotaxima, CFX - ceftioxitina, CF - cefalotina, CRM - cefuroxima, C - cloranfenicol, CIP - ciprofloxacina, FOS - fosfomicina, CN - gentamicina, LVX - levofloxacina, NET - netilmicina, F - nitrofurantoína, NOR - norfloxacina, P/T - pipetacilina/tazobactam, TI - ticarcilina, TOB - tobramicina, T/S - Trimetoprim/Sulfametoxazol; TCE - Traumatismo crâneo encefálico; Dc - Domicílio; DC(ac) – domicílio acamado; Δ -transferido do hospital de Guimarães; IRA - Insuficiência renal aguda; zaragatoa cutânea* - zaragatoa cutânea na escara na sacro

Tabela 17 (continuação) - Caracterização molecular dos isolados responsáveis por infeções de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs do hospital de Braga

Isolado (Data)	Idade/Sexo	Proveniência	Serviço	Produto Biológico	β -lactamases	Resistências associadas aos antibióticos não β -lactâmicos	PFGE
HB 167 (Fev, 12)	40/M	Dc	MFR	Urina	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, T/S	II
HB 168 (Fev, 12)	40/M	Dc	MFR	Urina	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, T/S	XXVII
HB 172 (Fev, 12)	82/M	♦	Medicina interna	Expectoração	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	NOR	XXIII
HB 173 (Mar, 12)	74/M	Dc(ac)	Urgência	Urina	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TOB, NXN, CIP, T/S	XII
HB 174 (Fev, 12)	45/M	Dc	Urgência	Urina	TEM (-1,-104,...), CTX-M 15/28	CN, TOB, CIP, T/S	XV
HB 177 (Mar, 12)	98/F	Dc(ac)	Urgência	Aspirado brônquico	CTX-M grupo 1	CN, TOB, CIP, LVX, T/S, F	XV
HB 179 (Fev, 12)	81/M	Dc	Urgência	Urina	CTX-M grupo 1	T/S	na
HB 182 (Fev, 12)	93/M	Dc	Ortopedia	Expectoração	OXA	CIP, LVX, T/S, F	na
HB 183	80/F	Dc	Cirurgia	Cálculo biliar	TEM	CN, TOB, NOR, CIP, T/S,	IX
HB 185 (Fev, 12)	76/F	Dc(ac)	Urgência	Urina	TEM, OXA	CN, TOB, T/S	na
HB 188 (Fev, 12)	85/M	Lar de idosos	Ortopedia	Urina	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	CN, TO, NOR, CIP, T/S	VII
HB 198 (Fev, 12)	93/M	Dc	Ortopedia	Urina	TEM, OXA	CN, TO, NA, NORN, CIP, T/S	na
HB 202 (Fev, 12)	74/ M	Dc	Urgência	Urina	TEM	TO, NOR, CIP, T/S	na
HB 203 (Fev, 12)	66/M	Dc	Medicina Interna	Urina	TEM, OXA	CN, TOB, T/S	na
HB 205 (Fev, 12)	67/M	Dc	Urgência	Urina	CTX-M grupo 1	CN, TOB, NOR, CIP, T/S, FOS	XVI

Legenda: (...) outras variantes da β -lactamase; na - não avaliado; Δ - transferido de um hospital do distrito de Braga para o Hospital de Braga, residente no domicílio; ♦ - transferido de um hospital do distrito do Porto para o Hospital de Braga, residente de uma UCCI no distrito de Braga; zaragatoa cutânea* - zaragatoa cutânea na escara na sacro; *** - não amplificou para os genes pesquisados no estudo *bla*TEM, *bla*OXA, *bla*SHV e *bla*CTX-M grupo 1; AK - amicacina, AUG - amoxicilina com ácido clavulânico, AM - ampicilina, CFZ - cefazolina, CPE - cefepime, CFT - Cefotaxima, CFX - cefoxitina, CF - cefalotina, CRM - cefuroxima, C - cloranfenicol, CIP - ciprofloxacina, FOS - fosfomicina, CN - gentamicina, LVX - levofloxacina, NET - netilmicina, FD - nitrofurantoína, NXN - norfloxacina, P/T - pipetacilina/tazobactam, TI - ticarcilina, TOB - tobramicina, T/S - Trimetoprim/Sulfametoxazol; TCE - Traumatismo crânio encefálico; Dc - Domicílio; DC(ac) - domicílio acamado; Δ - transferido do hospital de Guimarães; IRA - Insuficiência renal aguda; zaragatoa cutânea* - zaragatoa cutânea na escara na sacro

4.1 – Caracterização de isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL provenientes da Unidade de Cuidados Especiais de Neonatologia do Hospital de Braga

Isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL provenientes da Unidade de Cuidados Especiais de Neonatologia (UCEN) do hospital de Braga foram estudados durante o decorrer do estudo, devido à suspeita de surto na referida unidade. Este estudo foi incluindo neste trabalho devido à tentativa de demonstração da hipótese do aparecimento de isolados que possam justificar a sua origem relacionando com a ecologia bacteriana desta unidade de cuidados agudos e diferenciados e a influência extra-hospitalar e de outros serviços do hospital.

A suspeita de surto na UCEN do hospital de Braga ocorreu em dois momentos, correspondente à primeira suspeita de surto no período compreendido entre Março a Outubro de 2011 e a segunda de surto no período compreendido entre Maio a Julho de 2012. Na primeira suspeita de surto na UCEN foram estudados catorze isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL de onze recém-nascidos, provenientes de diferentes produtos biológicos: urina (n=8), hemocultura (n=4), cateter (n=1) e expectoração (n=1). No segundo episódio de suspeita de surto na UCEN foram estudados sete isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL provenientes de seis recém-nascidos internados na respetiva unidade, de diferentes produtos biológicos: exsudado rectal (n=6) e cateter (n=1) (Tabela 18). Os isolados provenientes de diferentes produtos biológicos são responsáveis por infeções nos recém-nascidos, exceto os isolados identificados nas amostras de zaragatoa rectal efectuadas para *screening* de colonização fecal por *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL.

Tabela 18 - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs da Unidade Especial de Cuidados de Neonatologia do Hospital de Braga

RN/Sexo (surto)	Isolado (Data)	Produto Biológico (Data do isolado)	CMI dos antibióticos β-lactâmicos															Perfil de suscetibilidade aos antibióticos não β-lactâmicos	β-lactamase	PFGE
			AM	AUG	CAZ	CAZ/CA	CF	CFT	CFT/CA	CFX	CFZ	CPE	CRM	ETP	MRP	IMP	P/T			
RN 1/M (1º surto)	H37	Urina (11-08-11)	>32	16	16		≥64	≥64		≥64				≤0,5	≤0,25		>128	CN, TOB, AK, CIP, LVX, T/S, TIG, F	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	XXIV
RN 2/F (1º surto)	H36	Expectoração (16-06-2012)	>32	16	16		≥64	≥64		≥64				≤0,5	≤0,25		>128	CN, TOB, AK, CIP, LVX, T/S, TIG, F	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	XXIV
RN 3/M (1º surto)	H27	Hemocultura (02-08-2011)	>32	16	≥64		≥64	≥64		≥64				≤0,5	≤0,25		>128	CN, TOB, AK, CIP, LVX, T/S, TIG, F	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	XXIV
	H34	Cateter (08-09-2011)	>32	>32	≥64		≥64	≥64		≥64				≤0,5	≤0,25		>128	CN, TOB, AK, CIP, LVX, T/S, TIG, F	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	XXIV
RN 4 M (1º surto)	H35	Urina (14-08-2011)	>32	>32	≥64		≥64	≥64		≥64				≤0,5	≤0,25		>128	CN, TOB, AK, CIP, LVX, T/S, F	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	XXIV
RN 5/M Urgência Pediátrica	H28	Urina (06-08-11)	>32	>32	16		≥64	4		≥64				≤0,5	≤0,25		≤4	CN, TOB, AK, CIP, LVX, T/S, TIG, F	TEM, CTX-M grupo 1	X
RN 6/M (1º surto)	H39	Urina (31-07-11)	>32	16	16		≥64	≥64		≥64				≤0,5	≤0,25		64	CN, TOB, AK, CIP, LVX, T/S, TIG, F	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	XXIV
RN 7 / M (1º surto)	H26	Urina (17-07-2011)	>32	16	16		≥64	≥64		≥64				≤0,5	≤0,25		64	CN, TOB, AK, CIP, LVX, T/S, TIG, F	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	XXIV
RN 8/M (1º surto)	H31	Hemocultura (28-07-11)	>32	16	≥64		≥64	≥64		≥64				≤0,5	≤0,25		>128	CN, TOB, AK, CIP, LVX, T/S, TIG, F	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	XXIV
	H21	Urina (29-08-11)	>32	16	≥64		≥64	≥64		≥64				≤0,5	≤0,25		>128	CN, TOB, AK, CIP, LVX, T/S, TIG, F	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	XXIV

Legenda: I/S - Idade/Sexo; RN - Recém-nascido; zar rectal - zaragatoa rectal, AK - amicacina, AUG - amoxicilina com ácido clavulânico, AM - ampicilina, CFZ - cefazolina, CPE - cefepime, CFT - Cefotaxima, CFX - cefoxitina, CF - cefalotina, CRM - cefuroxima, C - cloranfenicol, CIP - ciprofloxacina, FOS - fosfomicina, CN - gentamicina, LVX - levofloxacina, NET - netilmicina, F - nitrofurantoína, NOR - norfloxacina, P/T - pipetacilina/tazobactam, TI - ticarcilina, TOB - tobramicina, T/S - Trimetoprim/Sulfametoxazol; F- nitrofurantoína, C - cloranfenicol; si - sem informação; **Isolado resistente;** **Isolado com sensibilidade intermédia;** **Isolado sensível;** na - antibiótico não avaliado no teste de suscetibilidade aos antibióticos.

Tabela 18 (Continuação) - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs da Unidade Especial de Cuidados de Neonatologia do Hospital de Braga

RN/Sexo (surto)	Isolado (Data)	Produto Biológico	CMI dos antibióticos β-lactâmicos															Perfil de suscetibilidade aos antibióticos não β- lactâmicos	β-lactamase	PFGE
			AM	AUG	CAZ	CAZ/CA	CF	CFT	CFT/ CA	CFX	CFZ	CPE	CRM	ETP	MRP	IMP	P/T			
RN 9/F Urgência Pediátrica	H20	Hemocultura (25-10-11)	>32	16	≥64		≥64	≥64		≥64				≤0,5	≤0,25		64	CN, TOB, AK, CIP, LVX, T/S, TIG, F	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	XIII
RN 10/F (1º surto)	H24	Hemocultura (21-07-11)	>16	16/8	>16		>16	>32		>16		>16		≤1		≤1	64	CN, TOB, AK, CIP, LVX, T/S, TIG, F	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	XXIV
RN 11/M (1º surto)	H30	Urina (11-06-11)	>16	16/8	8	≤0,25	>16	>32	≤0,5	≤8	>16	>16	>16	≤1		≤1	≤8	CN, TOB, AK, CIP, LVX, T/S, TIG, F	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	XXIV
RN 12 (2º surto)	H122	zar rectal (23-05-2012)	>16	16/8	8	≤0,25	>16	>32	≤0,5	≤8	>16	>16	>16	≤1		≤1	≤8	CN, TOB, AK, CIP, LVX, T/S, TIG, F	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	XXIV
RN 13 (2º surto)	H124	Cateter (03-07-2012)	>16	16/8	8	≤0,25	>16	>32	≤0,5	≤8	>16	>16	>16	≤1		≤1	≤8	CN, TOB, AK, CIP, LVX, T/S, TIG, F	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	XXIV
	H134	zar rectal (03-07-2012)	>16	16/8	8	≤0,25	>16	>32	≤0,5	≤8	>16	>16	>16	≤1		≤1	≤8	CN, TOB, AK, CIP, LVX, T/S, TIG, F	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	XXIV
RN 14 (2º surto)	H129	zar rectal (26-02-2012)	>16	16/8	8	≤0,25	>16	>32	≤0,5	≤8	>16	>16	>16	≤1		≤1	≤8	CN, TOB, AK, CIP, LVX, T/S, TIG, F	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	XXIV
RN 15 (2º surto)	H130	zar rectal (23-06-2012)	>16	16/8	8	≤0,25	>16	>32	≤0,5	≤8	>16	>16	>16	≤1		≤1	≤8	CN, TOB, AK, CIP, LVX, T/S, TIG, F	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	XXIV
RN 16 (2º surto)	H133	zar rectal (23-05-2012)	>16	16/8	8	≤0,25	>16	>32	≤0,5	≤8	>16	>16	>16	≤1		≤1	≤8	CN, TOB, AK, CIP, LVX, T/S, TIG, F	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	XXIV
RN 17 (2º surto)	H132	zar rectal (27-06-2012)	>16	16/8	8	≤0,25	>16	>32	≤0,5	≤8	>16	>16	>16	≤1		≤1	≤8	CN, TOB, AK, CIP, LVX, T/S, TIG, F	TEM, OXA, CTX-M grupo 1	XXIV

Legenda: I/S - Idade/Sexo; RN - Recém-nascido; zar rectal - zaragatoa rectal, AK - amicacina, AUG - amoxicilina com ácido clavulânico, AM - ampicilina, CFZ - cefazolina, CPE - cefepime, CFT - Cefotaxima, CFX - cefoxitina, CF - cefalotina, CRM - cefuroxima, C - cloranfenicol, CIP - ciprofloxacina, FOS - fosfomicina, CN - gentamicina, LVX - levofloxacina, NET - netilmicina, F - nitrofurantoína, NOR - norfloxacina, P/T - pipetacilina/tazobactam, TI - ticarcilina, TOB - tobramicina, T/S - Trimetoprim/Sulfametoxazol; F- nitrofurantoína, C - cloranfenicol; si - sem informação;
Isolado resistente; **Isolado com sensibilidade intermédia;** **Isolado sensível;** na - antibiótico não avaliado no teste de suscetibilidade aos antibióticos.

A pesquisa de genes codificadores de β -lactamases permitiu a detecção de TEM, OXA e CTX-M grupo 1, com exceção num isolado correspondente ao recém-nascido 5 em que se obteve amplificação das β -lactamases TEM e CTX-M grupo 1. Os isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs, correspondentes à primeira e segunda suspeita de surto na UECN do hospital de Braga, apresentam resistência aos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas.

A suspeita de surto na UECN foi atribuída num primeiro momento ao recém-nascido 2, transferido de outra unidade hospitalar do distrito de Braga, onde se identificou o primeiro isolado de *Klebsiella pneumoniae* produtor de ESBL. Isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL com perfil fenótipo semelhante, foram identificados em diferentes produtos biológicos deste recém-nascido, internado durante um período longo na UECN e em produtos biológicos de outros recém-nascidos internados na referida unidade, posteriormente ao internamento do recém-nascido 2. Na segunda suspeita de surto, *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL foi identificada em produtos biológicos e em amostras do trato intestinal para detecção de colonização fecal.

O genótipo predominante *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA} e *bla*_{CTX-M grupo 1} e perfil de resistências associadas aos antibióticos não β -lactâmicos, particularmente aos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, sugere possível disseminação clonal de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL na UECN do hospital de Braga, confirmado por PFGE (Figura 25). Para confirmação da primeira suspeita de surto na UECN e detecção da origem foi avaliado um isolado de *Klebsiella pneumoniae* produtor de ESBL identificado no serviço de urgência pediátrica, que demonstram perfil genotípico de PFGE diferente, não relacionados epidemiologicamente.

4.2 – Estudo das relações clonais de isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs do estudo de colonização fecal e responsáveis por infeções do hospital de Braga

O estudo das relações clonais por PFGE de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL representativos do estudo de colonização fecal, isolados de infeções de vários serviços do hospital de Braga incluindo UECN permitiu identificar vinte e sete perfis de PFGE (Figura 26). Foram identificados quatro perfis de isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL estreitamente relacionados, com similaridade igual ou superior a 80%, nomeadamente perfil IX (84%), perfil XV (83%), perfil XIX (82%) e perfil XXIV (93%).

O perfil VI (92%) corresponde a isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de IMP-22 identificados no hospital de Braga, analisados no ponto 5 deste trabalho.

O perfil IX (84%) inclui dois isolados provenientes do estudo de colonização fecal, isolado no lar de idosos 7 e na UCCI 1, produtores de CTX-M grupo 1 e resistência comum à tobramicina. O perfil XV (83%) inclui dois isolados responsáveis por infecções de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL identificados no serviço de urgência do hospital de Braga, numa amostra de urina e numa amostra de aspirado brônquico. O isolado identificado na amostra de urina (HB174) apresenta genótipo *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M grupo 1} e o segundo isolado (HB177), identificado no produto biológico de aspirado brônquico *bla*_{CTX-M grupo 1}. Em relação ao perfil de resistências associadas, os isolados são resistentes à gentamicina, tobramicina, ciprofloxacina e trimetoprim-sulfametoxazol. O segundo isolado é ainda resistente à levofloxacina e nitrofurantoína. O perfil XIX (82%) apresenta dois isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL identificados no estudo de colonização fecal num residente da UCCI 3 (UC3-24) e um isolado responsável por infecção do hospital de Braga identificado numa amostra de urina, do serviço de MFR. O isolado do estudo de colonização fecal, produtor de β -lactamase do tipo TEM e com perfil de resistência a diferentes classes de antibióticos não β -lactâmicos, que inclui às fluoroquinolonas, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol e cloranfenicol, apresenta redução da suscetibilidade aos carbapenemos e à tigeciclina (ponto 5). O isolado responsável por infecção produtor de OXA e CTX-M grupo 1 é resistente à gentamicina, tobramicina e trimetoprim-sulfametoxazol.

O perfil XXIV (93%) é composto por vinte e nove isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs do tipo CTX-M grupo1, provenientes de isolados responsáveis por infecções do hospital de Braga, incluindo da UECN, e do estudo de colonização fecal a residentes de instituições extra-hospitalares. Os isolados de *Klebsiella pneumoniae* deste perfil apresentam características fenotípicas semelhantes, inerentes à produção de CTX-M grupo 1, predominantemente associado às β -lactamases OXA e TEM e resistência aos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas o que demonstra uma disseminação clonal intra-hospitalar e extra-hospitalar. O isolado de *Klebsiella pneumoniae* (HB50), incluindo neste perfil de PFGE, obtido numa amostra de expectoração no serviço de medicina interna, é produtor de IMP-22 (ponto 5). O estudo das relações clonais dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs permite verificar que isolados identificados em instituições, serviços e datas diferentes apresentam perfil comum evidenciando disseminação clonal. Os isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL estudados da UECN por suspeita de surto são do mesmo clone, podendo estar presente no ambiente deste serviço. A disseminação do

clone de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL é possível em casos de falhas nas medidas de controlo de infeção. Neste sentido, parece haver circulação no hospital deste perfil de PFGE de *Klebsiella pneumoniae* justificando disseminação intra-hospitalar entre diferentes unidades incluindo a UCEN. Possivelmente, doentes do lar de idosos 7 e da UCCI 1 em situação clínica aguda foram admitidos e com internamento ao hospital de Braga, justificando possível colonização fecal.

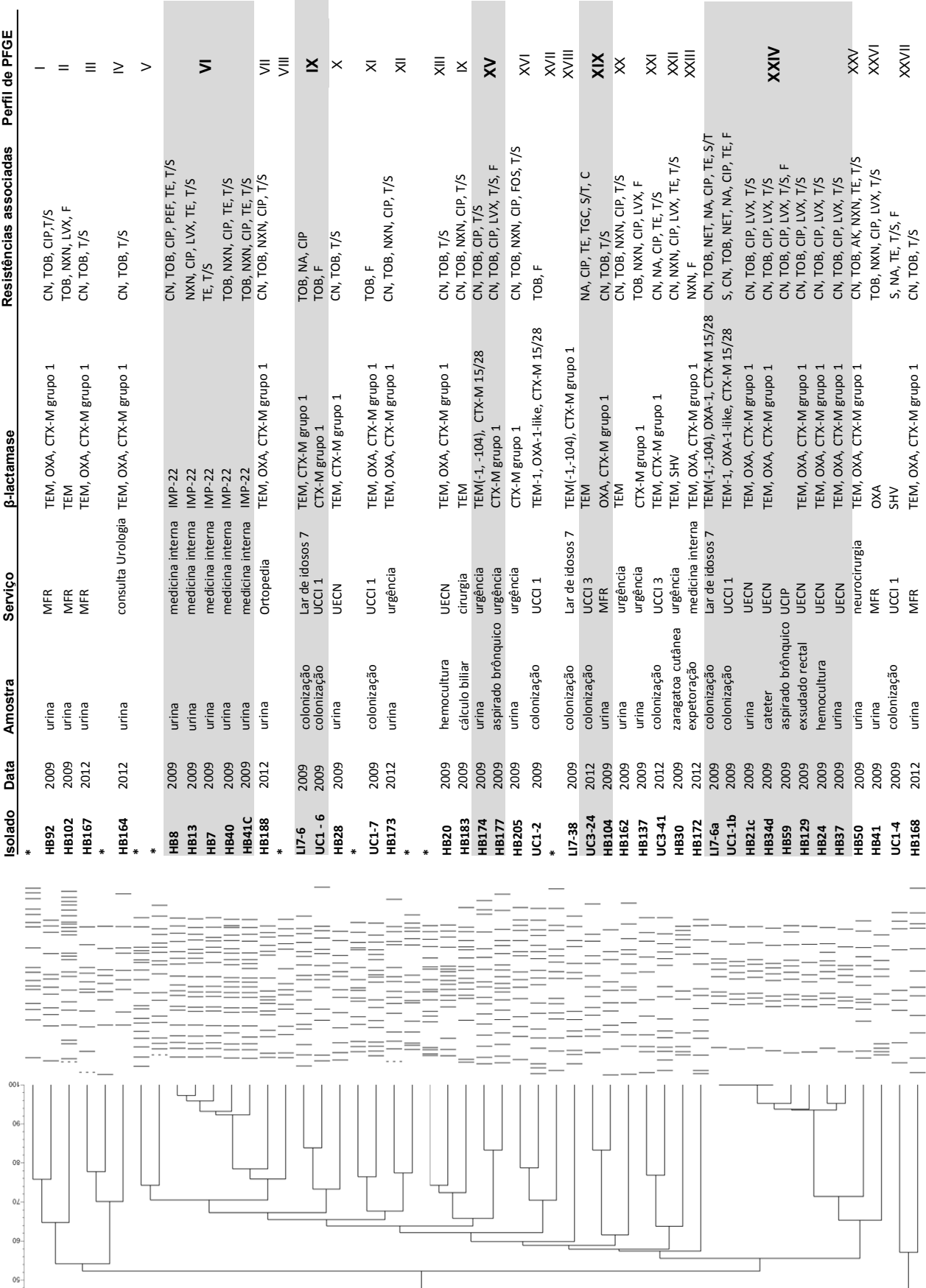


Figura 26 - Relação clonal dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs do Hospital de Braga e do estudo de colonização fecal a residentes de lares de idosos e de UCCI. Legenda: Perfis macrorestricção de DNA total de isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs provenientes do estudo de colonização fecal realizado em utentes de lares de idosos e UCCI digeridos com XbaI e analisados no software InfoQuest FP versão 5.4 (Bio-Rad Laboratórios). A percentagem de similaridade entre os isolados foi calculada pela aplicação do método de grupo ponderada de par com ligações médias (UPGMA) algoritmo com base no coeficiente de similaridade de Dice (1.5% de omissão; 1.5% de tolerância). Resistência aos antibióticos não β-lactâmicos dos isolados produtores de ESBLs: CIP - ciprofloxacina, T/S - Trimetoprim-sulfametoxazol, TOB - tobramicina, TE - tetraciclina, CN - gentamicina, PEF - pefloxacina, NXN - norfloxacina; (*) - isolado de *Klebsiella pneumoniae* não incluído no estudo; isolados de *Klebsiella pneumoniae* com perfil indistinguíveis: a - H35, H50, H124, H133, H126; b - H33, H30, H18, H22, H36, H21, H38, H25, H32, H27, c - H121, d - H134, H122, H127, H128

5 – Caracterização dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* e de *Escherichia coli* com redução da suscetibilidade aos carbapenemos do estudo de colonização fecal e responsáveis por infeções do hospital de Braga

Isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos provenientes do estudo de colonização fecal e do hospital de Braga foram estudados entre 2009 e 2012. No estudo de colonização fecal realizado a residentes de lares de idosos e de UCCI, do distrito de Braga e do Porto, foram detetados seis isolados de *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos. Os isolados foram identificados em dois residentes do lar de idosos 7 e em quatro doentes da UCCI 3, em Maio de 2009 e Fevereiro de 2012 respectivamente (Tabela 19). Isolados de *Klebsiella pneumoniae* e de *Escherichia coli* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos (n=20) responsáveis por infeções do hospital de Braga foram detetados entre Setembro de 2010 e Novembro de 2012, provenientes de dezoito doentes do mesmo hospital (Tabela 20).

5.1 – Caracterização dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos provenientes do estudo de colonização fecal

Os seis isolados de *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos foram identificados no estudo de colonização fecal, em duas instituições de prestação de cuidados de saúde na comunidade do distrito de Braga, nomeadamente lar de idosos 7 (n=2) e UCCI 3 (n=4) (Tabela 19). No lar de idosos 7 os isolados foram detetados em dois utentes, um dependente para as AVD's e outro independente. Na UCCI 3 foram identificados quatro doentes, três internados na unidade de LDM e um na unidade de MDR, com história de admissão recente na UCCI, referenciados do Hospital de Braga (3 doentes) e de um hospital central do Porto (1 doente), após abertura oficial da UCCI a 2 de Janeiro de 2012.

Os isolados de *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos provenientes do lar de idosos 7 foram isolados de meio de seleção de MacConkey agar com antibiótico cefotaxima e/ou aztreonamo e os isolados identificados na UCCI 3 em meio de seleção de MacConkey agar com antibiótico meropenemo. A avaliação do fenótipo de resistência determinado pelo teste de suscetibilidade aos

antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos evidencia resistência ao imipenemo e suscetibilidade ao meropenemo e dois isolados da UCCI 3, resistência ao ertapenemo. Os quatro isolados de *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos antibióticos da UCCI 3 e um isolado do lar de idosos 7 apresentam resistência ao ácido nalidíxico e ciprofloxacina, e dois isolados da UCCI 3 (UC3-31 e UC3-24) apresentam redução da suscetibilidade à tigeciclina a confirmar a nível molecular em estudo futuro (EUCAST, 2013).

Em cinco isolados de *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos não se detetou amplificação dos genes *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{IMP-22}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{NDM}. A redução da suscetibilidade aos carbapenemos pode ser explicada pela associação a outros mecanismos de resistência como produção de ESBLs e/ou de AmpC, associada à possível redução da permeabilidade da membrana externa.

A pesquisa de genes codificadores de carbapenemases nos isolados de *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos provenientes de duas instituições permitiu a deteção do gene *bla*_{IMP-22} num isolado da UCCI 3 (isolado UC3-22), que corresponde à primeira descrição de IMP-22 na comunidade. O isolado foi detetado num doente da UCCI 3, internado na UMR, com história de internamento no serviço de medicina interna do hospital de Braga e transferido após alta hospitalar para a UCCI 3.

Tabela 19 - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos e genes codificadores de β -lactamases dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos como colonizadores fecais de utentes do lar de idosos 7 e de doentes da UCCI 3

Instituição	Isolado (Data)	MS*	Idade/ Sexo	Informação Clínica	Origem**	Carbapenemos*** (halo em mm)			Resultado do teste de suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos****	β -lactamase
						IPM	ETP	MRP		
Lar de Idosos 7 (Março, 09)	LI7-3	CTX	s/i	s/i	s/i	18	nd	30	AMP, AMC, TZP, CTX, CAZ, FEP, ATM, FOX, TE, TGC, TOB, AK, NET, CN, T/S, NA, CIP, F, CS	TEM
	LI7-38	ATM	s/i	s/i	s/i	6	nd	30	AMP, AMC, TZP, CTX, CAZ, FEP, ATM, FOX, TE, TGC, S, TOB, AK, NET, CN, T/S, NA, CIP, C, F	TEM, CTX-M grupo 1
UCCI 3 (Fevereiro, 12)	UC3-22 (MDR)	MRP	63,M	AVC	HB, Med Int	11	12	26	AMP, AMC, TZP, CTX, CAZ, FEP, ATM, FOX, TE, TGC, S, TOB, CN, T/S, NA, CIP, C,	IMP - 22
	UC3-34 (LDM)	MRP	80,F	AVC	HB, Ortp	11	23	32	AMP, AMC, TZP, CTX, CAZ, FEP, ATM, FOX, TE, TGC, S, TOB, CN, T/S, NA, CIP, C,	nd
	UC3-31 (LDM)	MRP	65,F	AVC, endocardite, epilepsia, pneumonia	Hosp C, D, E	17	32	>30	AMP, AMC, TZP, CTX, CAZ, FEP, ATM, FOX, TE, TGC, S, TOB, CN, T/S, NA, CIP, C,	nd
	UC3-24 (LDM)	MRP	82,F	IRC, Fasceíte	HB, Med Int	6	7	30	AMP, AMC, TZP, CTX, CAZ, FEP, ATM, FOX, TE, TGC, S, TOB, CN, T/S, NA, CIP, C,	nd

Legenda: M - masculino, F - feminino, s/i - sem informação; AVC - acidente vascular cerebral; IRC - insuficiência renal crónica; MS* - meio de MacConkey agar com antibiótico β -lactâmico: CTX - cefotaxima (2 μ g/ml), ATM - aztreonamo (2 μ g/ml), MRP - meropenemo (1 μ g/ml); origem** - origem do doente antes da admissão na UCCI 3; HB, Med Int - Hospital de Braga, medicina interna; HB, Ortp - Hospital de Braga, Ortopedia; Hosp C, D, E - internamento por ordem cronológica, hospital C - distrito de Braga, hospital D e E - distrito do Porto; nd - não determinado no teste de suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos; *** halo de inibição em mm para os carbapenemos: IPM - imipenemo, ETP - ertapenemo, MRP - meropenemo; ****antibióticos β -lactâmicos e antibióticos não β -lactâmicos: AMP - ampicilina, AMC - amoxicilina com ácido clavulânico, TZP - piperacilina/tazobactam, CTX - cefotaxima, CAZ - ceftazidima, FEP - cefepime, ATM - aztreonamo, FOX - ceftaxitina, S - estreptomicina, CN - gentamicina, TOB - tobramicina, AK - amikacina, NET - netilmicina, TE - tetraciclina, TGC - tigeciclina, CIP - ciprofloxacina, NA - ácido nalidíxico, C - cloranfenicol, F - nitrofurantoína; T/S - trimetoprim-sulfametaxazol; nd - não foram detetados genes codificadores de carbapenemases *bla*_{IMP}, *bla*_{IMP-22}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{NDM}; **Isolado resistente**; **Isolado com sensibilidade intermédia**; **Isolado sensível**; na - antibiótico não avaliado no teste de suscetibilidade aos antibiótico

5.2 – Caracterização dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* e de *Escherichia coli* com redução da suscetibilidade aos carbapenemos do Hospital de Braga

Os isolados de *Klebsiella pneumoniae* e de *Escherichia coli* foram seleccionados por apresentarem redução da suscetibilidade a pelo menos um carbapenemo na avaliação do teste de suscetibilidade aos antibióticos realizado pelos sistemas automatizados Vitek e/ou Walkaway disponíveis no laboratório de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica do hospital de Braga. Isolados de *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos responsáveis por infeções do hospital de Braga foram identificados em diferentes produtos biológicos nomeadamente urina (n=6), expectoração (n=6), aspirado brônquico (n=4), hemocultura (n=2) e pús de sutura cervical (n=1). Os isolados foram identificados em diferentes serviços do hospital de Braga: medicina interna (n=7), UCIP (n=6), urgência (n=2), urologia (n=1) e neurocirurgia (n=1), e o isolado de *Escherichia coli* apresentando redução de suscetibilidade aos carbapenemos identificado numa amostra de urina de um doente internado no serviço de medicina interna.

Os resultados do teste E-test IP/IPI, para deteção fenotípica de MBLs, foram negativos para todos os isolados com redução da suscetibilidade aos carbapenemos. A análise do fenótipo de resistência dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* e de *Escherichia coli* com redução da suscetibilidade aos carbapenemos, a diferentes classes de antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos frequentemente utilizados em terapêutica clínica permite aferir que apresentam perfil multirresistente aos antibióticos (Tabela 20).

A caracterização de genes que codificam as carbapenemases KPC, IMP, IMP-22, VIM, NDM e OXA-48 e genes que codificam as β -lactamases TEM, SHV, CTX-M grupo 1 e OXA foram pesquisados nos isolados com redução da suscetibilidade aos carbapenemos. Dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* e de *Escherichia coli* redução da suscetibilidade aos antibióticos, dez isolados amplificaram para o gene *bla*_{IMP}, três isolados para o gene *bla*_{KPC} e oito não amplificaram nenhum dos genes que codificam carbapenemases pesquisados. Sequenciação do gene *bla*_{IMP} e do gene *bla*_{KPC} permitiu identificar IMP-22 (n=9) e KPC-3 (n=2) nos isolados de *Klebsiella pneumoniae*, e o gene *bla*_{KPC-3} e *bla*_{IMP-2-like} no isolado de *Escherichia coli* (Tabela 20). Nos isolados que não amplificaram nenhum gene que codifica carbapenemases podem estar presentes genes que codificam carbapenemases não estudadas no trabalho ou expressão de genes que codificam cefalosporinases AmpC ou ESBLs associado à redução da permeabilidade da

membrana externa pela redução da expressão de porinas da OmpK35 e OmpK36 justificando a diminuição da suscetibilidade aos carbapenemos.

Tabela 20 – Caracterização dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* e de *Escherichia coli* com redução da suscetibilidade aos carbapenemos do hospital de Braga

Identificação	Isolado (Data)	Produto Biológico	Idade /Sexo	Serviço	Informação Clínica	Origem*	CMI Carbapenemos (mg/l)			Suscetibilidade aos antibióticos β-lactâmicos e não β-lactâmicos***	β-lactamase
							IPM	ETP	MEP		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	HB1 (14-09-2010)	Urina	27/F	UCIP	Encefalite	Dc	nd	≥8	4	AMP, AMC, P/T, CF, CRM, CFT, CAZ, CN, TOB, AK, CIP, LVX, F, T/S, TIG	CTX-M grupo 1
	HB3 (06-09-2010)	Urina	77/F	UCIP	Tétano	Dc	nd	4	2	AMP, AMC, P/T, CF, CRM, CFT, CAZ, TOB, CN, AK, CIP, LVX, F, T/S, TIG	CTX-M grupo 1
	HB6 (08-09-2010)	Aspirado brônquico	49/M	UCIP	Tetraplegia	Lar de idosos	nd	≥4	4	AMP, AUG, P/T, CF, CRM, CFT, CAZ, CIP, CN, TOB, AK, LVX, F, T/S, TIG	CTX-M grupo 1
	HB7 (03-03-2011)	Hemocultura	92/F	Med int	ITU	Dc	2	4	≥16	PI, PTZ, TI, TIC, CAZ, CPE, ATM, TOB, CN, AK, CIP, T/S, CS, TE, MNO, PEF	IMP-22
	HB8 (11-05-2011)	Urina	36/M	Med int	Endocardite	Sem abrigo	≤1	≥8	≥16	TI, TIC, PI, P/T, CAZ, CPE, ATM, TOB, CN, AK, CIP, CS, T/S, TE, PEF, MNO	IMP-22
	HB13 (02-12-2011)	Urina	86/M	Med int	IRn	Dc	≤1	≤1	≥16	BLSE(-), AM, AUG, P/T, CAZ, CF, CFT, CFT/CA, CFX, CIP, CPE, CRM, FOS, TOB, NXN, CN, LVX, T/S, TE, F	IMP-22
	HB50 (30-04-2012)	Expectoração					4	4	≥16	BLSE(-), AMP, AUG, P/T, CF, CRM, FOX, CTX, CAZ, CPE, TOB, AK, CN, NOR, CIP, LVX, F, T/S, FOS, TE	IMP-22
	HB15 (28-12-2011)	Expectoração	77/F	Med int	Tumor cerebral, PN	Hosp G	4	4	≥16	BLSE(-), AMP, AUG, P/T, CAZ, CF, CFT, CFX, CRM, CFZ, CPE, TOB, CN, NOR, CIP, LVF, FOS, NA, T/S, AK, TE, TIG, F	IMP-22
	HB40 (29-01-2012)	Expectoração	80/M	Urg	Pancreatite aguda, IR	Dc	2	4	≥16	BLSE(-), AMP, P/T, TI, TIC, PI, AMC, CPE, CAZ, CF, CFT, CFX, CRM, CFZ, ATM, TOB, CN, AK, NOR, CIP, F, T/S, FOS, LVX, CS, T/S, PEF, MNO, TE	IMP-22
	HB41 (04-03-2012)	Expectoração	89/M	Urg	IRC, IR	Lar de Idosos	2	>1	≥16	BLSE(-), AMP, AMC, P/T, CAZ, CF, CFT, CFT/CA, CFX, CPE, TOB, CN, AK, NOR, CIP, LVX, F, FOS, T/S, TIG	IMP-22

Legenda: M - Masculino, F - feminino; CMI - Concentração mínima inibitória (mg/l), IPM - imipenemo, ETP - ertapenemo, MEP - meropenemo; * - origem do doente antes da admissão no Hospital de Braga: Dc - Domicílio, ** - residente em lar de idosos do distrito de Braga, Hosp G - doente transferido de um hospital do distrito de Braga não contemplado no estudo; Hosp B - doente transferido de um hospital do distrito de Braga não contemplado no estudo e diferente do hospital G; Hosp M* - doente transferido do Hospital de Santa Maria - Lisboa; Transf hospitalar ♦ - doente transferido do hospital de um hospital central do grande Porto; UCIP - Unidade de Cuidados Intensivos Polivalentes, Med int - medicina interna, Urg - urgência, Neuroc - neurocirurgia; *** - foram considerados os antibióticos testados pelo equipamento automatizado Vitek e Walkway na avaliação da suscetibilidade aos antibióticos β-lactâmicos e não β-lactâmicos. BLSE - β-lactamase de espectro alargado: (-) ausência de deteção pelo equipamento, (+) deteção de produção pelo equipamento, AMP - ampicilina, AMC - amoxicilina/ácido clavulânico, ATM - aztreonamo, CFZ - cefazolina, CPE - cefepime, CFZ - cefotaxime, CFX - cefoxitina, CPD - cefpodoxima, CRM - cefuroxima, CF - cefalotina, C - cloranfenicol, CIP - ciprofloxacina, FOS - fosfomicina, CN - gentamicina, LVX - levofloxacina, NET - netilmicina, F - nitrofurantoína, NOR - norfloxacina, P/T - piperacilina/tazobactam, TI - ticarcilina, TI/CLAV - ticarcilina/ácido clavulânico, TOB - tobramicina, T/S - trimetoprim/sulfametoxazole, TIG - tigeciclina, PI/CLAV - piperacilina/ácido clavulânico, PI - Piperacilina; PE - Pefloxacina, MI - Minociclina, CO - Colistina, na - antibiótico não avaliado; TVM - traumatismo vertebro-medular; IR - insuficiência respiratória, IC - insuficiência cardíaca; IRC - insuficiência renal crónica; ITU - Infecção do trato urinário, IRn - Insuficiência Renal, IH - Insuficiência Hepática, PN - Pneumonia Nosocomial; nd - não foram detetados genes codificadores de carbapenemases *bla*_{IMP}, *bla*_{IMP-22}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{NDM}; Isolado resistente; Isolado com sensibilidade intermédia; Isolado sensível; na - antibiótico não avaliado no teste de suscetibilidade aos antibiótico

Tabela 20 (Continuação) - Caracterização dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* e de *Escherichia coli* com redução da suscetibilidade aos carbapenemos do hospital de Braga

Identificação	Isolado (Data)	Produto Biológico	Idade /Sexo	Serviço	Informação Clínica	Origem*	CMI Carbapenemos (mg/l)			Suscetibilidade aos antibióticos β-lactâmicos e não β-lactâmicos***	β-lactamase
							IPM	ETP	MEP		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	HB52 (27-05-2012)	Expectoração	56/M	Med Int	Tumor da bexiga	Hosp B	≤1	4	≥16	BLSE(-), AUG, AM, P/T, FEP, CTX, CAZ, P/T, CF, CRM, FOX, CAZ, CRM, CF, IMP, TOB, AK, CN, NOR, CIP, LVX, FOS, F, T/S,	IMP-22
	HB57 (30-05-2012)	Pús (de sutura cervical)	62, M	UCIP	Broncorreia, Escabiose, PN	Dc		≥8	4	BLSE(+), AMP, AUG, P/T, CF, CRM, CTX, CAZ, AK, CN, TOB, CIP, LVX, NIT, T/S	nd
	HB58	Urina	55, M	urologia	Encefalopatia de Wernicke	Dc	≤1	4	≥16	BLSE(-), AUG, AM, P/T, FEP, CTX, CAZ, P/T, CF, CRM, FOX, CAZ, CRM, CF, IMP, NOR, CIP, LVX, FOS, GM, AK, TOB, F, T/S	IMP-22
	HB59	Aspirado brônquico	62, M	UCIP	Pneumonia	Transf hosp*		≥8	4	BLSE(-), AMP, AUG, P/T, CF, CRM, CTX, CAZ, CN, TOB, AK, CIP, LVX, F, T/S	nd
	HB120 (17-07-2012)	Aspirado brônquico	36, M	Neurocirurgia	TCE, PN	UCCI	2	≥8	4	BLSE(+), AMP, AUG, P/T, TI, TI/CLAV, PI, CF, CRM, CTX, CAZ, FEP, AK, CN, TOB, CIP, LVX, F, T/S, ATM, AK, PE, MI, CO	nd
	HB135 (27-07-2012)	Expectoração	67, M	Med int	PN, IH, IRn	Dc		≥8	4	BLSE(-), AMP, AUG, P/T, CF, CRM, CTX, CAZ, CN, AK, TOB, CIP, LVX, F, T/S	nd
	HB138	Hemocultura						≥8	4	BLSE(+), AMP, AUG, P/T, CF, CRM, CTX, CAZ, CN, TOB, AK, CIP, LVX, F, T/S	nd
	HB207 (6-11-2012)	Aspirado brônquico	38, M	UCIP	TVM, IR	Hosp M*	≥16	4	≥16	BLSE(+), AUG, AM, P/T, CF, CRM, CTX, CAZ, TI, TI/CLAV, PI, FEP, ATM, CN, TOB, AK, CIP, LVX, F, T/S, PE, MI, CO	CTX-M grupo 1, KPC-3
<i>Escherichia coli</i>	HB208 (20-11-2012)	Urina	84, M	Med Int	Encefalopatia hepática, IRC	Lar de idosos**	0,5	≥8	1	BLSE(+), AMP, AUG, P/T, TI, TI/AC, PI, CF, CRM, CTX, CAZ, FEP, ATM, AK, CN, TOB, CIP, LVX, F, T/S, PI/TAZ, PE, MI, CO, T/S	CTX-M grupo 1, KPC-3
	HB148 (27-09-2012)	Urina	86/M	Med Int	IRC, IC	Dc	≥16	≥ 8	≥ 16	BLSE(-), AMP, AUG, P/T, PI/TAZ, TI, TI/AC, PI, CF, CRM, CTX, CAZ, FEP, ATM, CN, TOB, AK, CIP, LVX, F, T/S, PE, MI, CO, T/S	IMP-2-like, KPC-3

Legenda: M - Masculino, F - feminino; CMI - Concentração mínima inibitória (mg/l), IPM - imipenemo, ETP - ertapenemo, MEP - meropenemo; * - origem do doente antes da admissão no Hospital de Braga; Dc - Domicílio, ** - residente em lar de idosos do distrito de Braga, Hosp G - doente transferido de um hospital do distrito de Braga não contemplado no estudo; Hosp B - doente transferido de um hospital do distrito de Braga não contemplado no estudo e diferente do hospital G; Hosp M* - doente transferido do Hospital de Santa Maria - Lisboa; Transf hospitalar * - doente transferido do hospital de um hospital central do grande Porto; UCIP - Unidade de Cuidados Intensivos Polivalentes, Med int - medicina interna, Urg - urgência, Neuroc - neurocirurgia; *** - foram considerados os antibióticos testados pelo equipamento automatizado ViteK e Walkway na avaliação da suscetibilidade aos antibióticos β-lactâmicos e não β-lactâmicos. BLSE - β-lactamase de espectro alargado: (-) ausência de deteção pelo equipamento, (+) deteção de produção pelo equipamento, AMP - ampicilina, AMC - amoxicilina/ácido clavulânico, ATM - aztreonamo, CFZ - cefazolina, CPE - cefepime, CFZ - cefotaxime, CFX - cefoxitina, CPD - cefpodoxima, CRM - cefuroxima, CF - cefalotina, C - cloranfenicol, CIP - ciprofloxacina, FOS - fosfomicina, CN - gentamicina, LVX - levofloxacina, NET - netilmicina, F - nitrofurantoína, NOR - norfloxacina, P/T - piperacilina/tazobactam, TI - ticarcilina, TI/CLAV - ticarcilina/ácido clavulânico, TOB - tobramicina, T/S - trimetoprim/sulfametoxazole, TIG - tigeciclina, PI/CLAV - piperacilina/ácido clavulânico, PI - Piperacilina; PE - Pefloxacina, MI - Minociclina, CO - Colistina, na - antibiótico não avaliado; TVM - traumatismo vertebro-medular; IR - insuficiência respiratória, IC - insuficiência cardíaca; IRC - insuficiência renal crónica; ITU - Infecção do trato urinário, IRn - Insuficiência Renal, IH - Insuficiência Hepática, PN - Pneumonia Nosocomial; nd - não foram detetados genes codificadores de carbapenemases *bla*_{IMP}, *bla*_{IMP-22}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{NDM}; Isolado resistente; Isolado com sensibilidade intermédia; Isolado sensível; na - antibiótico não avaliado no teste de suscetibilidade aos antibiótico

5.2.1 – Isolados responsáveis por infeções de *Klebsiella pneumoniae* produtores de IMP-22 no hospital de Braga

Nove isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de IMP-22 foram identificados entre Março de 2011 e Maio de 2012 em oito doentes internados no serviço de medicina interna, dois doentes admitidos no serviço de urgência e um doente internado no serviço de urologia do hospital de Braga. Os isolados foram identificados em diferentes produtos biológicos, nomeadamente urina (n=3), hemocultura (n=1) e expectoração (n=5). A idade dos doentes variou entre os 36 e os 92 anos, sendo maioritariamente idosos apresentando co-morbididades. A análise da informação clínica individual mostrou que todos os doentes apresentavam história de internamentos múltiplos durante vários anos e recentes, no referido hospital, com internamentos durante longos períodos no serviço de medicina interna. Foram estudados dois isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de IMP-22 responsáveis por infeções identificados no mesmo doente, em períodos diferentes. O primeiro isolado HB13 foi identificado em Dezembro de 2012, e o segundo isolado, HB50, em Abril de 2012, após um período de internamento numa UCCI da RNCCI no distrito de Braga.

Nos isolados produtores de IMP-22 não foi detetada produção de ESBLs e a deteção de MBLs por E-test IP/IPI, foi negativa. Os isolados apresentam redução da suscetibilidade ao meropenemo, CMI \geq 16 e redução de suscetibilidade variável ao ertapenemo. Em relação ao imipenemo, os isolados são sensíveis, exceto o isolado HB50, o que pode ajudar a explicar o resultado negativo no teste fenotípico de deteção de produção de MBLs, E-test IP/IPI. O gene *bla*_{IMP} foi detetado por PCR multiplex para os genes *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM} e *bla*_{IMP} e a sequenciação do gene *bla*_{IMP} permitiu a identificação de IMP-22 nos oito isolados, posteriormente foi também conseguida por PCR amplificação utilizando primers específicos para IMP-22.

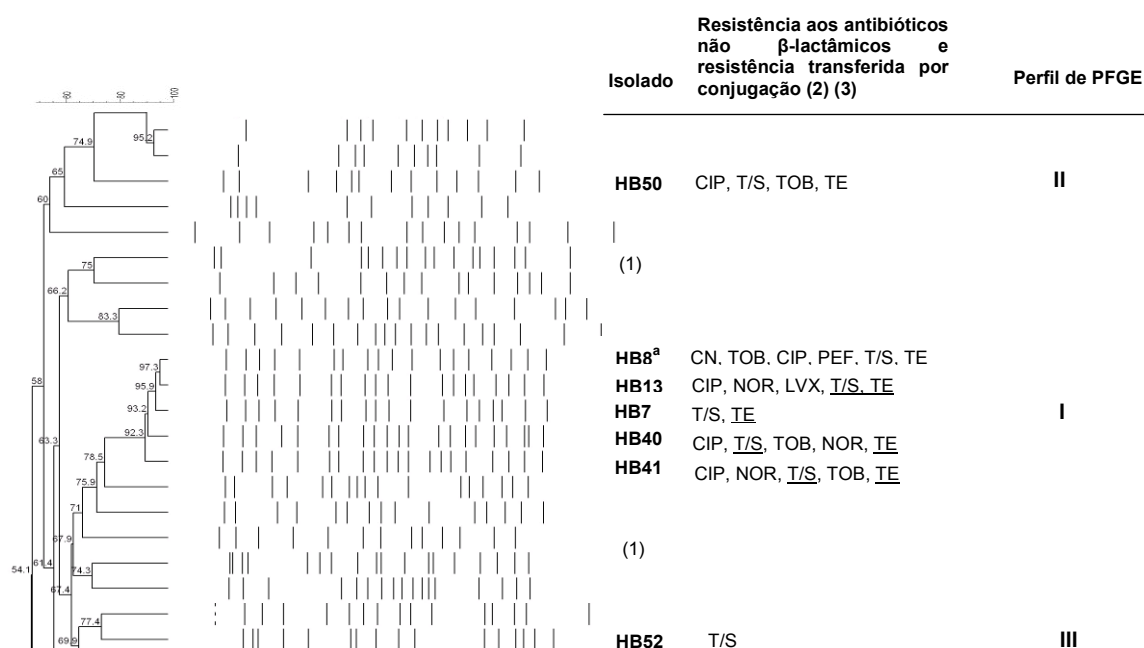


Figura 27 - Relação clonal dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de IMP-22 do hospital de Braga

Legenda: Perfil de macrorestrição de DNA total de isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de IMP-22 digeridos com *Xba*I e analisados no software InfoQuest FP versão 5,4 (Bio-Rad Laboratórios). A percentagem de similaridade dos isolados foi calculada pela aplicação do método de grupo ponderada com ligações médias (UPGMA) com base no algoritmo do coeficiente de similaridade de Dice (1,5% de otimização; 1,5% de tolerância). (1) Isolados não legendados, correspondem a isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs do hospital de Braga. (2) Resistência aos antibióticos não β-lactâmicos dos isolados produtores de IMP-22: CIP - ciprofloxacina, T/S - Trimetoprim-sulfametoxazol, TOB - tobramicina, TE - tetraciclina, CN - gentamicina, PEF - pefloxacina, TE - tetraciclina, NOR - norfloxacina; (3) - resistência aos antibióticos não β-lactâmicos transferida por conjugação encontra-se identificada a sublinhado; a - isolado H15, com perfil indistinguível com o isolado HB8.

Os isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de IMP-22 foram classificados em três perfis: perfil I, II e III (Figura 27). Seis isolados, HB8, HB13, HB7, HB40, HB41 e H15 pertencem ao perfil predominante, perfil I, com similaridade de 92,3%, enquanto os isolados HB50 e HB52, apresentam dois perfis diferentes, perfil II e perfil III, não relacionados entre si e nem com o perfil I. Os isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de IMP-22 do perfil I, foram isolados em quatro doentes internados no serviço de medicina interna, H7, H8, H13 e H15 e em dois doentes admitidos no serviço de urgência (H40 e H41), com história de internamentos recentes no serviço de medicina interna do referido hospital. O isolado H15, embora não esteja contemplado no dendrograma, apresenta perfil indistinguível avaliado no gel de PFGE segundo os critérios estabelecidos por Tenover e colaboradores (Tenover *et al*, 1995).

Os isolados, HB13 e HB50, foram identificados no mesmo doente, em períodos diferentes e apresentam perfis de PFGE diferentes. O isolado HB13 pertence ao perfil

predominante I, possivelmente adquirido durante o primeiro internamento no serviço de medicina interna do hospital, e o isolado HB50, identificado no segundo internamento, ao perfil II, depois de um período de internamento numa UCCI, no distrito de Braga. A transferência de resistência aos carbapenemos e outras classes de antibióticos não β -lactâmicos foi demonstrada pelo ensaio de conjugação em seis isolados de *Klebsiella pneumoniae* do perfil I (HB7, HB8, HB13, HB15, HB40 e HB41) (Figura 27).

O gene *bla*_{IMP-22} foi transferido com sucesso nos ensaios de conjugação e confirmada a sua presença nos seis transconjugantes. Estes resultados demonstram disseminação clonal de *Klebsiella pneumoniae* produtora de IMP-22 e possível disseminação plasmídica do gene *bla*_{IMP-22}.

5.2.2 – Caracterização dos isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de KPC-3

A caracterização de genes codificadores de carbapenemases permitiu a identificação do gene *bla*_{KPC-3} em dois isolados de *Klebsiella pneumoniae* e num isolado de *Escherichia coli* identificados em Setembro e Novembro de 2012, em três doentes internados no hospital de Braga.

O isolado de *Escherichia coli* produtor de KPC-3 foi o primeiro isolado detectado no hospital de Braga produtor de carbapenemase da classe A, numa amostra de urina de um doente do sexo masculino com 86 anos. O doente apresenta história de internamento durante vinte dias no serviço de medicina interna, com insuficiência cardíaca e renal, e com tratamento com amoxicilina com ácido clavulânico e ciprofloxacina, sem registo de tratamento com carbapenemos. A história clínica anterior do doente revela diversas comorbilidades e internamentos múltiplos no serviço de medicina interna do hospital de Braga. Os isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de KPC-3, HB207 e HB208, foram identificados em Novembro de 2012. O isolado de *Klebsiella pneumoniae* HB207 produtor de KPC-3 foi identificado numa amostra de aspirado brônquico, de um doente do sexo masculino de 36 anos, internado na UCIP, com história recente de transferência do hospital de Santa Maria-Lisboa. O segundo isolado de *Klebsiella pneumoniae* produtor de KPC-3, HB208, foi identificado numa amostra de urina, de um doente do sexo masculino com 80 anos, proveniente de um lar de idosos do distrito de Braga, internado no serviço de medicina interna.

O teste de suscetibilidade aos antibióticos demonstra que o isolado de *Escherichia coli*, HB148, apresenta um fenótipo de resistência aos diferentes carbapenemos

(imipenemo e meropenemo, CMI $\geq 16\text{mg/l}$, e ertapenemo CMI $\geq 8\text{mg/l}$) e resistência aos antibióticos não β -lactâmicos, nomeadamente aminoglicosídeos e fluoroquinolonas.

Os isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de KPC-3 em relação aos carbapenemos apresentam suscetibilidade variável, nomeadamente o isolado HB207, imipenemo e meropenemo, CMI $\geq 16\text{mg/l}$, e ertapenemo CMI 4mg/l , e o isolado HB208, imipenemo e meropenemo, CMI $0,5$ e 1 mg/l e ertapenemo CMI $\geq 8\text{ mg/l}$). O isolado de *Klebsiella pneumoniae* HB208 apresenta resistência à ciprofloxacina, levofloxacina e nitrofurantoína enquanto o isolado HB207 é resistente à gentamicina e tobramicina. Associado à expressão de carbapenemase, os isolados apresentam co-expressão de outras β -lactamases, ESBL e/ou MBLs, detetadas pelos métodos fenotípicos e/ou genotípicos. O resultado da pesquisa fenotípica por E-test IP/IPI para deteção de MBLs foi negativa nos três isolados. A pesquisa de genes codificadores de carbapenemases e ESBL permitiu a deteção do gene *bla*_{KPC-3} nos três isolados, e o gene *bla*_{CTX-M grupo 1} nos isolados de *Klebsiella pneumoniae* e o gene *bla*_{IMP-2like} no isolado de *Escherichia coli*.

DISCUSSÃO

***Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, das ESBL's às Carbapenemases colonização fecal e infeção: influência da população idosa e/ou dependente na região norte de Portugal**

O aumento do envelhecimento associado às situações de dependência, alterações fisiológicas, inerentes às múltiplas patologias típicas das idades mais avançadas e declínio do estado funcional, conduziram a novos desafios no sector dos cuidados de saúde. Novas dinâmicas de resposta à prestação de cuidados de saúde à população idosa e/ou dependente surgiram, particularmente na região norte, caracterizadas por um modelo de cuidados assente na proximidade (Abreu Nogueira, 2009). Instituições de prestação de cuidados de saúde, como é exemplo a realidade demonstrada em Portugal em lares de idosos, UCCI e IPSS, nomeadamente as detidas por instituições como Santa Casa da Misericórdia locais, são fundamentais no apoio social e de prestação de cuidados de saúde à população idosa e/ou dependente, nomeadamente as mais afastadas dos grandes centros urbanos.

Infeção e colonização por bactérias multirresistentes aos antibióticos são um problema emergente do século XXI em todo o Mundo, no sector dos cuidados de saúde (Schoevaerdt *et al*, 2012). A epidemiologia de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e de carbapenemases é complexa e dinâmica, emergindo em diferentes nichos, particularmente no dos cuidados de saúde, para o qual a população idosa e/ou dependente parece contribuir de forma relevante. O valor da prestação de cuidados a este grupo significativo da população é inestimável, alertando contudo para algumas questões em termos de ecologia bacteriana que poderão facilitar a disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos. *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs emergiram de forma significativa na comunidade, como demonstrado em estudos nacionais particularmente em isolados provenientes de laboratórios da comunidade, que em muitos dos casos recebem produtos biológicos de lares de idosos e/ou de UCCI (Pedrosa *et al*, 2007; Ferreira, 2008; Reguengo da luz, 2008; Cerdeira, 2012; Farinha, 2012) e em isolados responsáveis por infeções de unidades de cuidados agudos e diferenciados (Machado *et al*, 2006; Mendonça *et al*, 2006a; Mendonça *et al*, 2007; Mendonça *et al*, 2009; Espinar *et al*, 2011). Esta situação alertou, para uma realidade inerente à população idosa e/ou dependente que poderá estar colonizada por estes bacilos de Gram negativo multirresistentes aos antibióticos, apresentando implicações significativas associadas à mortalidade, morbilidade, aumento de infeções e aumento de custos de saúde inerente ao tratamento e insucesso terapêutico (Utsumi *et al*, 2010; Chong *et al*, 2011; Stuart *et al*, 2011; Schoevaerdt *et al*, 2012). Este grupo da

população, institucionalizada em lares de idosos, em UCCI, residente no domicílio e/ou internada em unidades hospitalares, apresenta elevado risco de colonização e/ou infeção por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e/ou de carbapenemases devido à idade avançada, debilidade do sistema imunitário, patologias, frequentes admissões em unidades hospitalares e utilização de outras tipologias de prestação de cuidados de saúde na comunidade (Esposito *et al*, 2007; Gruber *et al*, 2013; Marwick *et al*, 2013).

Este trabalho propôs-se estudar isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBLs e de carbapenemases, a nível fenotípico e genotípico, como colonizadores fecais de residentes de instituições de prestação de cuidados de saúde na comunidade, vocacionadas ao apoio social e prestação de cuidados de saúde à população idosa e/ou dependente, representativas da realidade na região norte de Portugal, como sejam lares de idosos e UCCI e isolados responsáveis por infeções do hospital de Braga. Desta forma pretende-se ilustrar as interações entre diferentes tipologias de resposta de apoio social e de prestação de cuidados de saúde, numa região em que as instituições de prestação de cuidados de saúde apresentam proximidade geográfica, funcionando como um modelo de disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e de carbapenemases. Os resultados do estudo são interpretados a seguir, evidenciando a importância da colonização e infeção na população idosa e/ou dependente como reservatório para a disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e/ou de carbapenemases.

Trato intestinal de residentes de lares de idosos e de Unidades de Cuidados Continuados Integrados: epicentro de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBLs e/ou apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos

A flora intestinal tem sido descrita nos últimos anos, como importante reservatório de bactérias multirresistentes aos antibióticos, com papel fundamental na disseminação de bactérias e de genes de resistência aos antibióticos a diferentes nichos, entre eles a comunidade e unidades de prestação de cuidados de saúde (Bonomo, 2000; Marshall *et al*, 2009; Ruppé and Andremont, 2013). Colonização fecal por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs em residentes de lares de idosos foi descrita em 1999, nos Estados Unidos da América, considerando estas instituições como importantes reservatórios de bacilos de Gram negativo resistentes aos antibióticos (Wiener *et al*, 1999).

Em Portugal, a colonização fecal por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e/ou apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos é ainda pouco

estudada. Estudos nacionais demonstram colonização fecal por *Enterobacteriaceae* produtora de ESBL em residentes de lares de idosos (Gonçalves, 2008; Gonçalves and Ferreira, 2009; Cerdeira, 2012), em adultos saudáveis (Machado *et al*, 2013), em crianças (Guimarães *et al*, 2009; Gonçalves *et al*, 2010; Rodrigues, 2011) e em doentes de um serviço de hemodiálise (Correia *et al*, 2012). Colonização fecal por *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases em Portugal, é descrita pela primeira vez neste trabalho.

As instituições de prestação de cuidados de saúde onde se procedeu à recolha de amostras de fezes de residentes para estudo de colonização fecal, apresentam características específicas inerentes ao ambiente institucional e dependência de cuidados de saúde dos residentes. Os primeiros lares de idosos apresentam características semelhantes a residências familiares, com poucos ou nenhum residente dependente de cuidados de saúde, evoluindo até típicas unidades de internamento semelhantes às das unidades hospitalares e/ou UCCI, adequando-se às necessidades de prestação de cuidados de saúde à população residente. As UCCI apresentam ambiente similar a unidades de internamento hospitalar inerente à especificidade da resposta de prestação de cuidados de saúde destas unidades da RNCCI.

Diferentes espécies da família *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL foram identificadas como colonizadoras fecais de residentes de instituições de prestação de cuidados de saúde extra-hospitalares. As espécies *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella oxytoca* foram identificadas em baixo número em residentes de lares de idosos, com poucos residentes dependentes de cuidados de saúde. *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL e *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos foram as principais espécies da família *Enterobacteriaceae*, identificadas como colonizadoras fecais de residentes de lares de idosos e de UCCI, nomeadamente nas instituições com maior número de residentes dependentes de cuidados de saúde. A colonização fecal por produtores de ESBL foi relevante em dois lares de idosos do distrito do Porto e um do distrito de Braga, e nas três UCCI do distrito de Braga. A colonização fecal por *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos ocorreu num lar de idosos e numa UCCI, do distrito de Braga.

As instituições extra-hospitalares, com maior número de residentes dependentes de prestação de cuidados de saúde, onde a colonização fecal dos residentes foi relevante, apresentam diferentes fatores de risco. Nestas instituições, os fatores de risco identificados encontram-se associados à idade e grau de dependência, co-morbilidades, presença de dispositivos médico invasivos particularmente cateteres urinários e sonda

nasogástrica, utilização frequente de antibióticos para tratamento das infeções mais comuns nas respectivas instituições, como infeção do trato urinário e infeção respiratória e presença de profissionais de saúde nomeadamente enfermeiros, durante vinte e quatro horas, de forma a assegurar a prestação de cuidados de saúde, de forma permanente. Esta realidade poderá ajudar a justificar a relevância da colonização por *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes aos antibióticos. Os fatores de risco, identificados nas instituições com maior número de residentes colonizados por estes bacilos de Gram negativo, contribuem para colonização e/ou infeção, como descrito na literatura (Paterson and Bonomo, 2005; Valverde *et al*, 2008; March *et al*, 2010; Birgand *et al*, 2012; Buul *et al*, 2012; Gruben *et al*, 2013; Han *et al*, 2013; Marwick *et al*, 2013). Adicionalmente, o modelo de prestação de cuidados de saúde parece facilitar a disseminação de *Enterobacteriaceae* multirresistentes aos antibióticos nestas instituições. O apoio social e cuidados de saúde a este segmento da população, centrados na proximidade dos residentes, com partilha do mesmo quarto, zonas de convívio social comuns, participação em actividades de grupo, com contacto próximo e frequente com residentes dependentes e profissionais, num ambiente marcado pela realização de inúmeros procedimentos de cuidados de saúde, funcionam como fatores de risco na colonização e/ou infeção, nestas instituições (Utsumi *et al*, 2010; Snyder *et al*, 2011; Buul *et al*, 2012; Schoevaerds *et al*, 2012). Infeções em residentes nestas instituições de prestação de cuidados de saúde, contribuem para o aumento do consumo de antibióticos (Buul *et al*, 2012), podendo contribuir para o risco de emergência de bactérias multirresistentes aos antibióticos na flora intestinal dos residentes (O'Fallon *et al*, 2009; de Lastors *et al*, 2013; Woether *et al*, 2013).

Escherichia coli produtora de ESBL é a espécie predominante como colonizadora fecal de residentes de lares de idosos e de UCCI, comparativamente a *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL, o que está de acordo com o demonstrado em estudos internacionais (Kassis-Chikhani *et al*, 2004; Nurul *et al*, 2005; Lautenbach *et al*, 2012; Jans *et al*, 2013). Este bacilo de Gram negativo produtor de ESBL foi identificado nas instituições com maior número de residentes dependentes de cuidados de saúde e características institucionais inerentes à prestação de cuidados de saúde de forma contínua, como se verificou no lar de idosos 5, lar de idosos 6, lar de idosos 7 e nas três UCCI. A relevância da deteção de *Escherichia coli* produtora de ESBL como colonizadora fecal de residentes de instituições extra-hospitalares parece reflectir a epidemiologia actual de produtores de ESBL na comunidade. Os residentes do lar de idosos 5, lar de idosos 6 e das UCCI requerem mais cuidados de saúde devido às situações de dependência, originando maior contacto com profissionais de saúde e procedimentos

médico invasivos, justificando a elevada colonização fecal, contrariamente aos residentes dos primeiros lares de idosos que apresentam maior número de residentes independentes. Estudos de colonização fecal realizados em instituições de prestação de cuidados de saúde na comunidade, similares à deste estudo, evidenciam resultados com diferenças significativas de prevalência de colonização fecal por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs em cada instituição, justificado pelas características diferentes da população de cada instituição, utilização de antibióticos, presença de fatores de risco e medidas de controlo de infeção aplicadas (Lautenbach *et al*, 2012).

O gene *bla*_{CTX-M grupo 1} foi identificado nos isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae*. Sequenciação do gene *bla*_{CTX-M grupo 1} apresenta possibilidade de CTX-M-15 ou CTX-M-28, a distinguir em estudo futuro de caracterização e diferenciação da região C terminal na extremidade 3' do gene *bla*_{CTX-M} (Menezes *et al*, 2010). Este gene foi detetado isolado ou associado à presença do gene *bla*_{TEM} e/ou ao gene *bla*_{OXA}. O genótipo *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA} e *bla*_{CTX-M grupo 1} é o predominante no estudo nos isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae*. Com efeito, na epidemiologia actual da ESBL do tipo CTX-M sustentada por publicações nacionais e internacionais, acredita-se que a enzima presente seja CTX-M-15, devido à elevada incidência, contrariamente à β -lactamase CTX-M-28, que não deve ser descurada, embora sejam poucas as descrições nacionais (Conceição *et al*, 2005; Mendonça *et al*, 2006; Machado *et al*, 2006; Mendonça *et al*, 2007; Machado *et al*, 2009c).

O gene *bla*_{CTX-M-32} foi detetado em dois isolados de *Escherichia coli* na UCCI 3, em dois doentes internados na UMDR e na ULDM, respetivamente com história de internamento em diferentes unidades hospitalares do distrito de Braga, hospital de Braga e num hospital próximo da referida unidade hospitalar, não contemplado no estudo. O gene *bla*_{CTX-M-32} poderá estar presente em outros isolados de *Escherichia coli* produtores de CTX-M da UCCI 3 não sequenciados. Em Portugal, o gene *bla*_{CTX-M-32} apresenta menor prevalência comparativamente ao gene *bla*_{CTX-M-15} (Mendonça *et al*, 2007).

Escherichia coli produtora de ESBL do tipo CTX-M do grupo 1 foi identificada como principal colonizadora do trato intestinal de residentes de lares de idosos e de UCCI da região norte. Estes isolados apresentam fenótipo de resistência às fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e tetraciclina, opções terapêuticas comuns no tratamento de infeções do trato urinário na comunidade (Qi *et al*, 2010). Os isolados de *Escherichia coli* resistentes aos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e tetraciclina sugerem que o gene *bla*_{CTX-M grupo 1} pode estar contido num plasmídeo albergando outros genes de resistência como *aac(6')-Ib-cr*, *qnrA*, *sul1* e *tetA*, merecendo estudo futuro a caracterização de plasmídeos nestes isolados. Os resultados parecem evidenciar a situação actual de

disseminação de isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBL do tipo CTX-M grupo 1 resistentes aos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas como colonizadores fecais de residentes de lares de idosos e de UCCI, como descrito em vários países (Esposito *et al*, 2007; Rooney *et al*, 2009; March *et al*, 2010; Dhanjii *et al*, 2008; Urban *et al*, 2010; Han *et al*, 2013; Luvsansharav *et al*, 2013). *Escherichia coli* resistente às fluoroquinolonas tem vindo a emergir nos cuidados de saúde, como em UCCI (Han *et al*, 2013). A identificação de isolados de *Escherichia coli* com características fenotípicas de resistência aos antibióticos e perfis de macrorestrição similares, em residentes de diferentes lares de idosos e UCCI, da região norte de Portugal, geograficamente próximos e identificados em períodos diferentes, sugere a disseminação de isolados produtores de ESBL do tipo CTX-M grupo 1 associado a clones multirresistentes aos antibióticos.

Os isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBL do tipo CTX-M grupo 1 pertencem ao grupo clonal pandémico e virulento O25b-ST131 e grupo filogenético B2 detetado por PCR, também demonstrado em estudo de colonização fecal em residentes de lares de idosos e/ou UCCI em Espanha (Lugo) (Blanco *et al*, 2009); Irlanda (Burke *et al*, 2012) e Alemanha (Arvand *et al*, 2013). O perfil de virulência comum nos isolados de *Escherichia coli* produtores de CTX-M grupo 1 deste grupo clonal inclui o gene que codifica a ilha de patogenicidade (PAI) e os factores de virulência *fimH*, *traT*, *chuA*, *fuyA* e *fyuV*. Estes factores de virulência têm sido descritos associados a *Escherichia coli* uropatogénica e do grupo clonal O25b-ST131, relevante na colonização do trato intestinal, e fator de risco para o desenvolvimento de infeção urinária (Spurbeck *et al*, 2012). Isolados de *Escherichia coli* uropatogénica podem persistir durante longo tempo como comensais no trato intestinal, podendo colonizar o trato urinário com possível desenvolvimento de infeção do trato urinário (Narciso *et al*, 2010; Spurbeck *et al*, 2012). Estes isolados de *Escherichia coli* colonizadoras fecais têm características de verdadeiras *Escherichia coli* responsáveis por infeções extra-intestinais, devido ao fenótipo de multirresistência aos antibióticos e características de virulência, do tipo das responsáveis por infeções urinárias. Estes isolados de *Escherichia coli* comensais, poderão estar relacionados com o desenvolvimento de infeção do trato urinário, ajudando a compreender a prevalência de infeções do trato urinário nestas instituições extra-hospitalares.

Klebsiella pneumoniae produtora de ESBL identificada como colonizadora fecal, em residentes de três instituições do distrito de Braga, nomeadamente lar de idosos 7, UCCI 1 e UCCI 3 é produtora de β -lactamases do tipo TEM, OXA e CTX-M grupo 1, na maior parte dos isolados. A avaliação clonal de isolados de *Klebsiella pneumoniae*, demonstra disseminação de um clone, em duas valências de cuidados diferentes da

mesma instituição, lar de idosos 7 e UCCI 1, que pertencem a uma instituição da Santa Casa da Misericórdia local do distrito de Braga. Isolados de *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos foram identificados como colonizadores fecais de residentes do lar de idosos 7 e em doentes internados na UCCI 3, ambas as instituições do distrito de Braga e próximas da unidade hospitalar contemplada neste estudo.

O gene *bla*_{IMP-22} foi identificado num isolado de *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos, correspondendo à primeira descrição em Portugal de isolados produtores de carbapenemases como colonizadores fecais na prestação de cuidados de saúde extra-hospitalares. *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases como colonizadoras fecais têm sido descritas em alguns países (March *et al*, 2010), corroborando os nossos resultados de disseminação destes produtores nos cuidados de saúde aos mais idosos.

Co-colonização fecal por *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBLs foi detetada em residentes do lar de idosos 7 e da UCCI 3. Co-colonização por *Escherichia coli* produtora de ESBL e *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução de suscetibilidade aos carbapenemos, foi detetada em residentes da UCCI 3. A transmissão plasmídica de genes codificadores de ESBLs e de carbapenemases é possível no trato intestinal (Ruppé *and* Andreumont, 2013), contribuindo para a multirresistência de bacilos de Gram negativo comensais.

Ficou demonstrado que o trato intestinal de residentes de lares de idosos e de UCCI da região norte de Portugal funciona como importante reservatório de:

- *Escherichia coli* produtora de ESBL do tipo CTX-M grupo 1 do grupo clonal pandémico e virulento O25b-ST131;
- *Klebsiella pneumoniae* produtora de TEM, OXA e CTX-M grupo 1;
- *Klebsiella pneumoniae* com redução da suscetibilidade aos carbapenemos e produtora de IMP-22.

O estudo alerta para a colonização fecal por *Escherichia coli* produtora de ESBL do tipo CTX-M grupo 1 do grupo clonal pandémico e virulento O25b-ST131 e o início de colonização fecal por *Enterobacteriaceae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos e produtoras de carbapenemases, que parecem estar a emergir de forma significativa nesta região do País. Estes resultados do estudo de colonização fecal, são relevantes em termos epidemiológicos e clínicos, pois demonstram riscos inerentes a disseminação e desenvolvimento de infeção nestas instituições, particularmente infeção do trato urinário.

Lares de idosos e UCCI são fundamentais no apoio social e prestação de cuidados de saúde à população idosa e/ou dependente e constituem importantes reservatórios para disseminação na comunidade, de *Escherichia coli* produtora de ESBL do grupo clonal O25b-ST131 (Oteo *et al*, 2006; Valverde *et al*, 2008; Blanco *et al*, 2009; Bertrand *et al*, 2012; Van der Donk *et al*, 2013), *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL e produtora de carbapenemases.

Os resultados do estudo demonstram disseminação de *Escherichia coli* do grupo clonal pandémico O25b-ST131, em colonização fecal em residentes de diferentes instituições extra-hospitalares geograficamente muito próximas e com maior relação em termos de transferência dos residentes e com o hospital de Braga, mas aparece também em instituições mais afastadas de um distrito diferente e próximas do litoral. Profissionais de saúde e outros prestadores de cuidados, funcionam como fator de risco importante na disseminação de *Enterobacteriaceae* multirresistentes aos antibióticos em instituições de prestação de cuidados de saúde extra-hospitalares (March *et al*, 2010; Buul *et al*, 2012). Os procedimentos inerentes à prestação de cuidados de higiene e aspiração de secreções podem estar associados ao risco de transmissão de *Enterobacteriaceae* multirresistentes aos antibióticos, como são exemplos *Escherichia coli* produtora de ESBL e resistente às fluoroquinolonas do grupo clonal O25b-ST131 e produtores de carbapenemases. Esta situação pode ocorrer devido a falhas de boas práticas na execução de técnica asséptica destes cuidados (Han *et al*, 2013). Falhas no controlo de infeção nestas unidades inerente, justificadas pelo baixo número de profissionais para prestar cuidados a um número, muitas vezes, elevado de residentes, associado ao fator tempo de prestação de cuidados. Também a redução de custos, inerentes à compra de materiais essenciais para diminuição de risco de infeção cruzada na prestação de cuidados como sejam luvas, aventais, soluções desinfetantes e hidratantes poderão contribuir para o estabelecido. O circuito incorreto dos lixos e rejeição de materiais de higiene, como fraldas, esponjas e resguardos que poderão conter resíduos de material fecal, são importantes fatores que poderão contribuir para a disseminação de bactérias multirresistentes aos antibióticos nestas instituições. A redução de custos em instituições de prestação de cuidados de saúde extra-hospitalares condicionou em alguns casos a redução de contratação de profissionais, enfermeiros e auxiliares de ação médica, conduzindo a situações de um número elevado de doentes para cada enfermeiro. Esta situação poderá levar a situações de menor tempo na prestação de cuidados, propiciando menor rigor na prestação de cuidados e falhas nas medidas de controlo de infeção. Neste sentido, *Enterobacteriaceae* multirresistentes aos antibióticos presentes nas fezes, aquando da prestação de cuidados como os de higiene, podem contribuir para a

disseminação no ambiente institucional, a outros doentes institucionalizados, profissionais e comunidade (de Lastors *et al*, 2013).

O trabalho demonstra colonização fecal por produtores de ESBLs e apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos nos primeiros residentes da UCCI 3, após abertura oficial da mesma. Falhas nas medidas de controlo de infeção poderá condicionar o aparecimento destes multirresistentes aos antibióticos no ambiente das instituições extra-hospitalares, como em cadeiras, mesas, camas e materiais de prestação de cuidados, sendo necessário medidas de vigilância do ambiente institucional. É de enfatizar a necessidade de aplicação de medidas de controlo de infeção como higiene das mãos, utilização de luvas e aventais de utilização única por doente, nestas instituições, caracterizadas pelos cuidados prestados e pela proximidade de doentes e profissionais, fundamentais para limitar a disseminação destes bacilos de Gram negativo multirresistentes no ambiente intra-institucional e extra-institucional (Magiorakos *et al*, 2012; Gruber *et al*, 2013; Han *et al*, 2013; Landelle *et al*, 2013; Ludden *et al*, 2013), assim como prescrição adequada de antibióticos (Enne, 2010).

A colonização do trato intestinal deste nicho da população, é um risco inerente à disseminação de *Escherichia coli* e de *Klebsiela pneumoniae* multirresistentes aos antibióticos aos cuidados de saúde hospitalares, a outras tipologias de cuidados de saúde extra-hospitalares, a doentes institucionalizados e profissionais na mesma instituição (March *et al*, 2010) e à comunidade (Falagas and Karageorgopoulos, 200; Löhr *et al*, 2013). Em algumas instituições de apoio social e de prestação de cuidados de saúde, como é exemplo a instituição da Santa Casa da Misericórdia, apresentam diferentes tipologias de cuidados na mesma instituição, como, unidade hospitalar, lar de idosos, UCCI e jardim-de-infância, com valências e zonas de convívio social comuns. A interação de crianças e idosos na mesma instituição tem valor na socialização e diminuição da solidão dos mais idosos. Considerando os resultados deste estudo de colonização fecal esta realidade poderá trazer desvantagens relacionadas com a disseminação de bacilos de Gram negativo, através dos profissionais que são comuns às duas valências. Em algumas instituições de apoio social e de prestação de cuidados de saúde deste estudo, é verificada esta situação. Diferentes instituições de cuidados em que, em muitas situações, os profissionais colaboram nas diferentes tipologias da mesma instituição, particularmente enfermeiros e auxiliares, e também profissionais que colaboram nestas instituições e em unidades hospitalares, realidade que poderá facilitar a disseminação na própria instituição.

***Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs responsáveis por infecções provenientes do hospital de Braga**

Isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL foram identificados em amostras de urina, num grupo de doentes com mais de 60 anos, particularmente entre os 70 e 89 anos. Este grupo da população idosa parece recorrer com frequência ao hospital de Braga, em situações de agudização da situação clínica e/ou intervenções programadas, apresentando múltiplas admissões no serviço de urgência e internamentos em diferentes serviços de especialidade. Um número relevante é proveniente do domicílio, com residência no distrito de Braga, onde alguns doentes em situação de elevada dependência se encontram acamados. Embora o número de doentes residentes em instituições de prestação de cuidados de saúde não tenha sido significativo, alguns encontram-se institucionalizados em lares de idosos, outros recebem apoio de cuidados de saúde no domicílio, por instituições de apoio domiciliário da área de residência ou por equipas de cuidados paliativos das Unidades de Saúde Familiar, segundo o levantamento de informações dos processos clínicos registados pelo corpo clínico. Esta situação alerta para a relevância nesta região, dos cuidados de saúde prestados no domicílio, a este grupo muito significativo da população e mais vulnerável, podendo ser comum a outras regiões do País.

Os isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL foram identificados em diferentes produtos biológicos, particularmente em amostras de urina de doentes com infeção do trato urinário e/ou infeção renal, provenientes de diferentes serviços de internamento da unidade hospitalar, como serviço de medicina interna, medicina física e de reabilitação e urologia, serviço de urgência e consultas externas de especialidade. A consulta dos processos individuais dos doentes permitiu verificar que apresentam na sua maioria fatores de risco inerentes à infeção e/ou colonização por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL como sejam a presença de cateteres urinários, particularmente em doentes com infeção do trato urinário e/ou infeção renal e tetraplégicos, cateteres venosos periféricos, centrais e arteriais, entubação oro/naso-traqueal, sonda oro/nasogástrica, gastrostomia percutânea endoscópica e jejunostomia, entre outros procedimentos médico invasivos. Fatores de risco de infeção em doentes internados nos cuidados de saúde hospitalares são similares aos fatores de risco descritos em residentes de instituições de prestação de cuidados de saúde extra-hospitalares (Falagas and Karageorgopoulos, 2009), no entanto existem fatores de risco relacionados com procedimentos médico invasivos típicos, de âmbito hospitalar. Nas unidades hospitalares com internamento, particularmente em unidades de cuidados

intensivos, a vulnerabilidade do doente, os procedimentos médico invasivos referidos anteriormente, intervenções cirúrgicas, ventilação e utilização de oximino-cefalosporinas e fluoroquinolonas são fatores de risco importantes nestas instituições relacionadas com infeção e/ou colonização por *Enterobacteriaceae* multirresistentes aos antibióticos (Falagas and Karageorgopoulos, 2009).

Escherichia coli produtora de ESBL é a espécie predominante em isolados responsáveis por infeções do hospital de Braga, comparativamente a *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL. A predominância de isolados de *Escherichia coli* produtora de ESBL parece demonstrar mudança no género que preferencialmente albergava ESBLs, nas últimas décadas, em unidades hospitalares (Peirano *et al*, 2010), podendo estar relacionada com a colonização fecal por *Escherichia coli* produtora de ESBL. Os resultados demonstram neste conjunto de isolados responsáveis por infeções, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL particularmente do tipo CTX-M grupo 1, com possibilidade de CTX-M-15 ou CTX-M-28, no hospital de Braga. O gene *bla*_{CTX-M grupo 1}, com forte possibilidade de CTX-M-15, foi detetado isolado ou associado à presença do gene *bla*_{TEM} e/ou *bla*_{OXA}, tal como nos isolados de colonização fecal. Sequenciação do gene *bla*_{TEM} e *bla*_{OXA} revela a presença de TEM-1 e em alguns isolados diferentes variantes de TEM, mas com forte possibilidade de TEM-1, e OXA-1-like.

Os isolados de *Escherichia coli* produtora de ESBL responsáveis por infeções, apresentam de forma geral, resistência às fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e trimetoprim-sulfametoxazol, como observado em isolados responsáveis por infeções em diversos países (Johnson *et al*, 2013; Östholm-Balkhed *et al*, 2013). O aumento da co-resistência limita as opções terapêuticas (Johnson *et al*, 2013; Paphitou, 2013; Östholm-Balkhed *et al*, 2013). A maior parte dos isolados de *Escherichia coli* são sensíveis à fosfomicina, ampicacina, nitrofurantoína, colistina e tigeciclina.

Os resultados descritos pela primeira vez, nesta unidade hospitalar, parecem refletir a situação descrita em isolados responsáveis por infeções em diferentes unidades de cuidados agudos e diferenciados no País, com disseminação de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtora de TEM, OXA e CTX-M particularmente CTX-M-15, representando a ESBL predominante no País (Conceição *et al*, 2005; Brizio *et al*, 2006; Mendonça *et al*, 2006a, Machado *et al*, 2006; Mendonça *et al*, 2007; Narciso *et al*, 2012).

A descrição de *Enterobacteriaceae* produtora de ESBL do tipo CTX-M multirresistentes aos antibióticos em isolados responsáveis por infeções nos cuidados agudos e diferenciados alertam para a importância do nicho dos cuidados de saúde à população idosa, como possível reservatório para a disseminação destes isolados. Em

2003, um isolado de *Escherichia coli* resistente à cefotaxima produtor de CTX-M-14, foi identificado numa amostra de fezes de uma mulher com 76 anos da região norte, sem história recente de internamento em unidade hospitalar e/ou em unidade de cuidados continuados, e sem exposição prévia a antibióticos, no período inferior a três meses, anteriores à recolha da amostra (Mendonça *et al*, 2004). Mais tarde, em 2006, a primeira descrição de *Escherichia coli* produtora de *bla*_{CTX-M-15}, associada à produção de *bla*_{TEM-1} e *bla*_{OXA-30}, em isolados responsáveis por infeções em dois doentes, com 65 e 90 anos, internados em dois hospitais geograficamente distantes, hospital Garcia da Orta em Lisboa e hospital de Vila Real (Mendonça *et al*, 2006a). O doente com 65 anos residente num lar de idosos e o segundo doente apresentava história recente de internamento hospitalar (Mendonça *et al*, 2006a). Outro estudo demonstra um número muito significativo de isolados produtores de ESBL do tipo CTX-M-15 (92%) em amostras de urina de doentes de ambos os sexos com mais de 60 anos (Mendonça *et al*, 2007). No mesmo ano, isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs do tipo CTX-M-15 co-produtores de OXA-1 e TEM-1, foram identificados maioritariamente em isolados de dois hospitais e um laboratório da comunidade, com um nicho significativo de população idosa da comunidade e residente em lares de idosos da região (Machado *et al*, 2006). Em 2007, foram identificados uma percentagem significativa de isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs, particularmente do tipo CTX-M em nove hospitais diferentes em três regiões do País, provenientes de doentes com mais de 60 anos (Mendonça *et al*, 2007). Descrições nacionais de produtores de ESBLs deixam transparecer que a população idosa e/ou dependente é um nicho significativo que parece ter contribuído para disseminação hospitalar, particularmente de *Escherichia coli* produtora de *bla*_{CTX-M-15}. Outros estudos, particularmente na região norte de Portugal, demonstram disseminação de *Escherichia coli* produtora de CTX-M-15, no ambiente (Machado *et al*, 2008, Rocha *et al*, 2008). Estudos em unidades hospitalares descrevem este genótipo associado a genes de resistência a outros grupos de antibióticos, como *aac(6')-Ib-cr*, em isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* em Portugal (Machado *et al*, 2006) e na literatura internacional (Hoban *et al*, 2012; Peirano *et al*, 2010, Ruiz *et al*, 2012). Também, no ambiente Enterobacteriaceae produtoras de CTX-M com perfil de multirresistência incluindo aos aminoglicosídeos foi descrita, nesta região do País (Rocha and Ferreira, 2005, Rocha and Ferreira, 2006).

A deteção de um número de isolados considerável nos serviços de urgência e de consulta externa do hospital de Braga, alerta para a possível disseminação na comunidade, de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de CTX-M grupo 1, resistente aos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, nesta região do País, ainda pouco

estudada. A deteção de um número relevante destes bacilos de Gram negativo multirresistentes aos antibióticos neste hospital, poderá ser reflexo da epidemiologia desta região, o qual poderá ter um papel fundamental na epidemiologia destes bacilos de Gram negativo multirresistentes como reservatório de disseminação (Mirelis *et al*, 2003) aos cuidados agudos e diferenciados facilitado pela admissão da população idosa e/ou dependente. A admissão hospitalar de doentes do domicílio é importante em termos epidemiológicos, relevante para a possível colonização por *Enterobacteriaceae* multirresistentes aos antibióticos, apresentando um papel muito significativo na disseminação intra-hospitalar e comunidade, incluindo familiares e crianças, como descrito na literatura (March *et al*, 2010; Marwick *et al*, 2013).

Os isolados responsáveis por infeções de *Klebsiella pneumoniae* do hospital de Braga foram detetados maioritariamente em amostras de urina, como se verificou com os isolados de *Escherichia coli* produtora de ESBL e em produtos biológicos do trato respiratório. *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL do tipo CTX-M-15 desde a primeira descrição em 2005, num isolado de hemocultura no Hospital de Santa Maria, Lisboa, têm vindo a aumentar em Portugal seguindo a tendência mundial, (Conceição *et al*, 2005). Estudos nacionais evidenciam disseminação de *Klebsiella pneumoniae* produtora de CTX-M-15 em unidades de cuidados hospitalares (Machado *et al*, 2006; Mendonça *et al*, 2009) e associada à população idosa (Manageiro *et al*, 2012a), e em estudos internacionais *Klebsiella pneumoniae* produtora de CTX-M-15 multiresistentes aos antibióticos na comunidade, em isolados hospitalares (Carrër and Nordmann, 2011; Chouchani *et al*, 2012), em adultos e em recém-nascidos (Oteo *et al*, 2009).

Medidas de controlo de infeção nas unidades de cuidados agudos e diferenciados parecem ser mais rigorosas, direccionando-se essencialmente para a prevenção de transmissão doente-doente, doente-profissional, na colonização de superfícies, equipamentos médicos e mãos dos profissionais (Falagas and Karageorgopoulos, 2009).

***Klebsiella pneumoniae* produtora de *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA} e *bla*_{CTX-M} grupo 1 como colonizadora fecal de residentes de lares de idosos e de UCCI e em isolados responsáveis por infeções do hospital de Braga**

A disseminação de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente aos antibióticos é um problema significativo em unidades hospitalares e na comunidade pelo impacto das infeções associadas a morbilidade e mortalidade elevadas (Keynam and Rubinstein, 2007; Chouchani *et al*, 2012). *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL do tipo CTX-M

grupo 1 foi a segunda espécie da família *Enterobacteriaceae* identificada como colonizadora fecal de residentes de lares de idosos e de UCCI e em isolados responsáveis por infeções de uma unidade hospitalar, na região norte de Portugal. Os isolados responsáveis por infeções do hospital de Braga foram identificados em doentes, maioritariamente com mais de 60 anos, admitidos em diferentes serviços da unidade hospitalar, como serviço de medicina física e de reabilitação, serviço de urgência e serviço de consultas externas de especialidade. Esta informação alerta para a possível disseminação de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL na comunidade.

O genótipo *bla*_{TEM-1}, *bla*_{OXA-1-like} e *bla*_{CTX-M grupo 1} provavelmente *bla*_{CTX-M-15} foi identificado nos isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistente aos antibióticos, particularmente aos aminoglicosídeos, nas diferentes instituições de prestação de cuidados de saúde, lar de idosos 7, UCCI 1 e UCCI 3, do distrito de Braga. Isolados de *Klebsiella pneumoniae* com o mesmo perfil fenotípico e genotípico foram identificados na UECN do hospital de Braga, em dois períodos diferentes, estudados devido à suspeita de surto na referida unidade. O clone de *Klebsiella pneumoniae* produtor de TEM-1, OXA-1-like e possivelmente CTX-M-15 resistente aos aminoglicosídeos é evidenciado no estudo de relações clonais por PFGE, merecendo estudo futuro para caracterização de ST.

A disseminação do clone de *Klebsiella pneumoniae* produtor de TEM, OXA e CTX-M do grupo 1 é evidenciado em diferentes serviços do hospital de Braga, em isolados responsáveis por infeções a um grupo de doentes com mais de 60 anos, em isolados de colonização fecal e responsáveis por infeções da UECN do hospital de Braga, e como colonizador fecal de um residente de um lar de idosos e de duas UCCI, do distrito de Braga. As unidades de neonatologia são locais ideais para a disseminação de *Klebsiella pneumoniae* resistente aos antibióticos e ocorrência de surtos, devido a internamento prolongado dos recém-nascidos, utilização frequente de antibióticos e de procedimentos médico invasivos (Tamma *et al*, 2012; Cantey *et al*, 2013; Sumer *et al*, 2013). Colonização fecal por *Klebsiella pneumoniae* é um importante factor de risco em instituições de prestação de cuidados de saúde associado a surtos como em unidades de neonatologia, responsável por insucesso terapêutico, prolongamento de internamentos e morte (Keynam and Rubinstein, 2007). A disseminação intra-hospitalar de *Klebsiella pneumoniae* poderá estar associada aos profissionais de saúde, que em muitas situações colaboram em outros serviços da unidade hospitalar, direccionados à prestação de cuidados à população adulta e idosa.

O surto por *Klebsiella pneumoniae* produtora de TEM, OXA e CTX-M grupo 1 na UECN do hospital de Braga poderá ter sido devido a falhas no controlo de infeção que podem justificar a disseminação aos recém-nascidos nesta unidade, situação evidenciada

em estudos similares de surtos em unidades de neonatologia (Tamma *et al*, 2012; Sumer *et al*, 2013). Após alta hospitalar os recém-nascidos podem permanecer colonizados podendo disseminar à comunidade nomeadamente aos familiares, incluindo os mais idosos e instituições como jardim-de-infância (Löhr *et al*, 2013; Strenger *et al*, 2013). Medidas de controlo de infeção, inerentes às superfícies e profissionais, vigilância contínua de infeção e de colonização fecal são fundamentais nestas unidades de prestação de cuidados de saúde a recém-nascidos (Cantey *et al*, 2013; Sumer *et al*, 2013).

Disseminação intra-hospitalar e extra-hospitalar de um clone de *Klebsiella pneumoniae* produtora de TEM, OXA e CTX-M grupo 1 é evidenciado neste estudo. A resistência aos antibióticos e perfil de β -lactamases é semelhante aos isolados de *Escherichia coli*, parecendo sugerir transferência de β -lactamases inter-géneros de *Enterobacteriaceae*, o que poderá ser justificado caso haja transferência por conjugação. Um isolado de *Klebsiella pneumoniae* produtor de IMP-22 é do clone predominante de *Klebsiella pneumoniae* produtor de ESBLs, identificado nos isolados da neonatologia e de instituições extra-hospitalares. O lar de idosos 7 e UCCI 1, pertencem a uma instituição da Santa Casa da Misericórdia, geograficamente próxima do hospital de Braga, que funciona como unidade hospitalar de referência de doentes em situação de agudização do estado de saúde e/ou intervenções programadas, destas instituições extra-hospitalares. Este clone de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL parece estar bem instalado no ambiente do hospital de Braga, disseminando provavelmente após alta hospitalar para instituições de prestação de cuidados de saúde na comunidade. Esta questão alerta também para a hipótese inversa de (re)-introdução no hospital aquando de admissão de doentes que apresentam risco de colonização com estes isolados, a partir de lar de idosos e de UCCI, demonstrando um ciclo de disseminação contínuo. Outra hipótese a considerar, no aparecimento de *Klebsiella pneumoniae* produtora de TEM, OXA e CTX-M grupo 1 no lar de idosos e na UCCI, será a possível disseminação através de profissionais de saúde. Enfermeiros do hospital de Braga colaboram profissionalmente nas duas tipologias de cuidados da instituição extra-hospitalar, lar de idosos 7 e UCCI 1 (informação pessoal da direcção da Instituição da Santa Casa da Misericórdia).

***Escherichia coli* produtora de CTX-M grupo 1 do grupo clonal pandémico e virulento O25b-ST131 em isolados de colonização fecal e em isolados responsáveis por infeções do hospital de Braga**

Escherichia coli produtora de ESBL do tipo CTX-M multirresistente aos antibióticos é um importante agente de infeções hospitalares e na comunidade que pode funcionar como reservatório de clones epidémicos (Burke *et al*, 2012; Lautenbach, 2013). Este bacilo de Gram negativo é o principal agente de infeções do trato urinário, em todos os grupos etários (Croxall *et al*, 2011; Niki *et al*, 2011). A disseminação pandémica de ESBL, na comunidade e em unidades hospitalares, em isolados de *Escherichia coli* é facilitada por clones de elevado risco como o grupo clonal O25b-ST131 produtor de CTX-M-15, com contribuição significativa em infeções extra-intestinais como infeção do trato urinário, devido às características de virulência (Nicolas-Chanoine *et al*, 2008; Dhanjii *et al*, 2008; Peirano *et al*, 2010; Johnson and Stell, 2000; Croxall *et al*, 2011; Gilbreel *et al*, 2012; Novais *et al*, 2012; Pitout, 2012; Tinelli *et al*, 2012; Blanco *et al*, 2013; Colomer-Lluch *et al*, 2013; Dahdi *et al*, 2013; López-Cerero *et al*, 2013a; López-Cerero *et al*, 2013b).

Isolados de *Escherichia coli* produtora de CTX-M grupo 1, provavelmente CTX-M-15, do grupo clonal O25b-ST131 e grupo filogenético B2 determinado por PCR (Clermont *et al*, 2009) são demonstrados pela primeira vez num estudo de colonização fecal na população idosa e/ou dependente, residente em lares de idosos e em UCCI e em isolados responsáveis por infeções de uma unidade hospitalar da região norte de Portugal. Estes isolados apresentam fenótipo multirresistente aos antibióticos particularmente aos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e trimetoprim-sulfametoxazol, como evidenciado na literatura (Maslow *et al*, 2004; Maslow *et al*, 2005; Magiorakos *et al*, 2012; Vimont *et al*, 2012; Colomer-Lluch *et al*, 2013; Han *et al*, 2013a; Lautenbach *et al*, 2013; Östholm Balkhed *et al*, 2013). Este grupo clonal produtor de ESBL, multirresistente aos antibióticos particularmente às fluoroquinolonas e virulento tem sido descrito desde 2008, data de início do presente trabalho, em vários países (Blanco *et al*, 2013; de Lastours *et al*, 2013; Liss *et al*, 2013; López-Cerero *et al*, 2013a; López-Cerero *et al*, 2013b), merecendo também atenção em Portugal (Novais *et al*, 2012; Narciso *et al*, 2012; Calhau *et al*, 2013; Pomba *et al*, 2013).

As relações clonais dos isolados de *Escherichia coli* produtores de CTX-M grupo 1 do grupo clonal O25b-ST131, de colonização fecal das diferentes instituições extra-hospitalares do distrito de Braga e Porto e responsáveis por infeções do hospital de Braga, foram determinadas por PFGE. Foram identificados 10 perfis de PFGE muito relacionados entre si, com similaridade $\geq 80\%$, correspondente a diferenças em 4 a 6

bandas (Rogers *et al*, 2011). Nestes perfis de PFGE identificados com elevada similaridade, verificou-se a presença de isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs do grupo clonal O25b-ST131 de diferentes lares de idosos e UCCI, do distrito de Braga e Porto, e isolados responsáveis por infeções do hospital de Braga, identificados em diferentes datas e serviços. A literatura refere que isolados de *Escherichia coli* do grupo clonal O25b-ST131 podem apresentar diferentes perfis de PFGE (Clermont *et al*, 2009; Rogers *et al*, 2011; Dahdi *et al*, 2013), o que parece acontecer com os isolados do estudo. Outros estudos referem que diferentes perfis de PFGE podem apresentar sub- clones do grupo clonal como o clone H30 (Colpan *et al*, 2013; Johnson *et al*, 2013), diferentes β -lactamases, fenótipo de resistência aos antibióticos não β -lactâmicos e genes de virulência (Nicolas-Chanoine *et al*, 2008; Rogers *et al*, 2011; Dahbi *et al*, 2013; Olesen *et al*, 2013). Considerando a literatura internacional recente, isolados de *Escherichia coli* do grupo clonal O25b-ST131 apresentam diversos perfis de PFGE relacionados a $\geq 60\%$ (Clermont *et al*, 2009; Johnson *et al*, 2013), alertando para os resultados do estudo, podendo tratar-se do mesmo grupo clonal quando relacionados a $\geq 60\%$. A análise do PFGE a $\geq 60\%$ de similaridade evidencia que os isolados de *Escherichia coli* de diferentes instituições se encontram relacionados entre si, evidenciando características comuns predominantes como presença do gene *bla*_{CTX-M} grupo 1, resistência aos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, gene *acc(6)'-Ib-cr*, grupo filogenético B2, perfil similar de genes de virulência, com presença de PAI, *fimH*, *chuA*, *fyuA*, *KpsMT-K5* e *traT* e amplificação por PCR para pesquisa do grupo clonal O25b-ST131.

A combinação do fenótipo de multirresistência aos antibióticos e virulência parece ser uma explicação plausível para o sucesso e instalação bem sucedida de *Escherichia coli* do grupo clonal O25b-ST131, como emergente, promovendo expansão clonal e disseminação a diversos nichos (Rogers *et al*, 2011; Calhau *et al*, 2013; Kudinha *et al*, 2013). Este grupo clonal, predominante em isolados responsáveis por infeções e em isolados comensais, está associado à disseminação de ESBL do tipo CTX-M, resistência às fluoroquinolonas e genes de virulência, relacionados com infeções extra-intestinais (Rogers *et al*, 2011; Gibreel *et al*, 2012; Johnson *et al*, 2012; Vimont *et al*, 2012; Colomer-Lluch *et al*, 2013; Nicolas-Chanoine *et al*, 2013). O grupo clonal de elevado risco O25b-ST131 é actualmente o predominante em todo o mundo, apesar das diferenças fenotípicas e genotípicas, que pode apresentar e variações de PFGE (Johnson *et al*, 2013). Estudos referem que este grupo clonal está associado predominantemente à ESBL do tipo CTX-M-15, podendo contemplar outras ESBL do tipo CTX-M como CTX-M-32, como verificado em dois isolados de colonização fecal produtores destas β -

lactamases. Estudos mais recentes mencionam que pode estar associado a isolados de *Escherichia coli* não produtora de ESBL, mas resistentes às fluoroquinolonas (Nicolas-Chanoine *et al*, 2013; Jonhson *et al*, 2013).

O predomínio deste grupo clonal no trato intestinal da população idosa é descrito como importante na disseminação nos cuidados de saúde (Rogers *et al*, 2011; Dahbi *et al*, 2013; Totsika *et al*, 2011). *Escherichia coli* produtora de CTX-M grupo 1 resistente às fluoroquinolonas do grupo clonal O25b-ST131 é um importante colonizador intestinal da população institucionalizada em unidades de prestação de cuidados de saúde extra-hospitalares, na região norte do País. Infecções neste grupo da população podem estar relacionadas com isolados comensais do trato intestinal de *Escherichia coli* deste grupo clonal do grupo filogenético B2 (Nicolas-Chanoine *et al*, 2013; Han *et al*, 2013). Neste sentido, a população idosa e/ou depende, proveniente do domicílio, admitida no hospital de Braga também poderá estar colonizada por *Escherichia coli* com as mesmas características de multirresistência aos antibióticos, evidenciadas nos respectivos isolados responsáveis por infecções.

O perfil de virulência *fimH*, *iha*, *sat*, *iutA*, *fyuA*, *traT*, *malX*, *usp* e *ompT* tem sido associado a isolados de *Escherichia coli* produtores de CTX-M-15 do grupo clonal O25b-ST131 (Rogers *et al*, 2011; Novais *et al*, 2012). No sentido de demonstrar o potencial virulento dos isolados de *Escherichia coli* colonizadores fecais de residentes de lares de idosos e de UCCI, e em isolados responsáveis por infecções identificados maioritariamente em amostras de urina de doentes admitidos em diferentes serviços da unidade hospitalar, foram pesquisados diferentes genes codificadores de fatores de virulência. O gene de virulência *fimH* que codifica fímbria do tipo 1 (*fimH*) foi o fator de virulência predominante nos isolados de *Escherichia coli* estudados colonizadores do trato intestinal e em isolados responsáveis por infecções. Este fator de virulência, importante na colonização do epitélio do trato urinário, é encontrado frequentemente em isolados responsáveis por infecções do trato urinário e em isolados comensais (Rogers *et al*, 2011; Narciso *et al*, 2012; Qin *et al*, 2013; Totsika *et al*, 2011), o que reforça a importância dos isolados colonizadores fecais de residentes de lares de idosos e de UCCI no desenvolvimento de infecções urinárias (Croxall *et al*, 2011). Este fator de virulência encontra-se relacionado com cistite e pielonefrite reforçando a sua importância em situações iniciais de desenvolvimento de infecção do trato urinário (Narciso *et al*, 2012), representando um alvo potencial para desenvolvimento de vacinas (Spurbeck *et al*, 2012; Barber *et al*, 2013; Kudinha *et al*, 2013). Os fatores de virulência *fyuA* e *chuA*, *KpsM III-K5*, *traT* foram identificados de forma relevante nos isolados de *Escherichia coli* do grupo clonal O25b-ST131 estudados, do estudo de colonização fecal e de isolados

responsáveis por infecções, de acordo com o evidenciado em estudos internacionais (Rogers *et al*, 2011). Em isolados de *Escherichia coli* extra-intestinal adesinas, toxinas e sideróforos estão envolvidos na colonização do trato intestinal com sucesso (Köhler and Dobrindt, 2011).

A β -lactamase CTX-M grupo 1 é predominante nos isolados de *Escherichia coli* responsáveis por infecções do hospital de Braga, tal como a encontrada em isolados comensais. A população idosa e/ou dependente, institucionalizada em lares de idosos e em UCCI, assim como residentes no domicílio, que parecem recorrer com frequência ao hospital de Braga, podem representar um importante reservatório do grupo clonal O25b-ST131 (Banerjee *et al*, 2013). O estudo descreve características dos isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs do tipo CTX-M grupo 1 resistentes às fluoroquinolonas do grupo clonal de elevado risco O25b-ST131 no hospital de Braga e em instituições na comunidade vocacionadas à população idosa e/ou dependente similar ao encontrado em estudos Europeus (Nicolas-Chanoine *et al*, 2008; Burke *et al*, 2012; Nicolas-Chanoine *et al*, 2013). Episódios de infeção, como infeção do trato urinário, são frequentes em doentes da comunidade e institucionalizada, particularmente em unidades de cuidados hospitalares. *Escherichia coli* uropatogénica tem sido reconhecida no grupo clonal O25b-ST131 exibindo características específicas, como fatores de virulência, fenótipo e genótipo selectivos e multirresistentes aos antibióticos (Gibreel *et al*, 2012; Ferjani *et al*, 2013; Reyna-Flores *et al*, 2013). A sinergia de multiresistência aos antibióticos e fatores de virulência em linhagens clonais de sucesso são inerentes a situações de colonização intestinal, por longos períodos e desenvolvimento de infeções com possível insucesso terapêutico. Os isolados de colonização intestinal de residentes de instituições extra-hospitalares apresentam características de típicos isolados extra-hospitalares com potencial de multiresistência aos antibióticos e virulência de patogénicos oportunistas. Os isolados de *Escherichia coli* comensais, comparativamente aos isolados de *Escherichia coli* responsáveis por infeções, apresentam perfil de genes de resistência aos antibióticos e genes codificadores de fatores de virulência significativos. O internamento em unidades extra-hospitalares com pressão constante num ambiente favorável à disseminação de bactérias multirresistentes aos antibióticos, parece não estar presente em doentes no domicílio e poderá ajudar a explicar os resultados deste estudo.

Os nossos resultados sugerem que a transmissão doente-doente e/ou doente-profissional são fatores chave na disseminação deste isolado multirresistente aos antibióticos (Nicolas-Chanoine *et al*, 2013). A disseminação do grupo clonal O25b-ST131 no hospital e na comunidade, em residentes de lares de idosos e de UCCI, é evidenciada

pela identificação de perfis de PFGE com elevada similaridade. Como demonstrado no trabalho, perfis de PFGE similares foram encontrados em instituições da comunidade do distrito de Braga e Porto, em diferentes datas e em isolados responsáveis por infeções do hospital de Braga. A mobilização de doentes entre as diferentes tipologias de cuidados de saúde parece acontecer com alguma frequência. As informações individuais dos doentes da UCCI 3 revelam que podem ser admitidos em diferentes instituições da comunidade e unidades hospitalares. Alguns doentes da UCCI 3 colonizados por *Escherichia coli* produtora de CTX-M grupo 1 do grupo clonal O25b-ST131 apresentam história de internamento no hospital de Braga particularmente no serviço de medicina interna e em UCCI do distrito do Porto (no início deste trabalho era o lar de idosos 5, que passou recentemente a UCCI), verificando-se que os isolados apresentam o mesmo perfil de PFGE correspondendo à presença do mesmo grupo clonal O25b-ST131. Dois doentes da UCCI 3 provenientes do domicílio encontram-se colonizados por *Escherichia coli* do grupo clonal O25b-ST131, alertando para a possibilidade de colonização fecal por estas estirpes multirresistentes, na comunidade. Esta situação ilustra as possíveis relações de (re)-circulação do grupo clonal O25b-ST131 entre as diferentes tipologias de cuidados de saúde na região norte de Portugal, favorecidos pela mobilização da população idosa e/ou dependente de cuidados de saúde colonizada entre várias instituições (Birgand *et al*, 2013), atribuindo a esta população a atenção fundamental para perspectiva de controlo de infeção regional (Han *et al*, 2013).

Estratégias de prevenção são imprescindíveis nestes nichos, de forma a controlar a disseminação do grupo clonal multirresistente aos antibióticos e virulento O25b-ST131, que deverão ser aplicadas em doentes colonizados e em doentes com infeção (Han *et al*, 2013). Também deverá ser dada atenção a outros grupos da população como sendo as crianças, que em muitas situações compartilham espaços comuns e apresentam relações de proximidade com os mais idosos, na mesma instituição ou no domicílio.

***Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemases no hospital de Braga e na prestação de cuidados de saúde extra-hospitalar**

A emergência e disseminação de *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenemos é uma ameaça global de saúde pública, particularmente em instituições de prestação de cuidados de saúde, associadas ao aumento da mortalidade, morbilidade, custos de saúde e insucesso terapêutico (Giske *et al*, 2008; Adler *et al*, 2011; Livermore *et al*, 2011). Em Portugal as primeiras carbapenemases foram descritas em 1998 em

isolados de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* produtores de MBLs em unidades hospitalares e no ambulatório e em 2004 em *Enterobacteriaceae* (Conceição *et al*, 2005; da Silva *and* Duarte, 2011). Isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de carbapenemases da classe A e classe B e isolados apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos, responsáveis por infeções provenientes do hospital de Braga (Gonçalves *et al*, 2012; Gonçalves *et al*, 2013a; Gonçalves *et al*, 2013b) e como colonizadores fecais de residentes de instituições de prestação de cuidados de saúde extra-hospitalares, foram identificadas pela primeira vez neste estudo na região norte de Portugal, alertando para o início de um novo ciclo de disseminação de isolados multirresistentes aos antibióticos.

Os isolados de *Klebsiella pneumoniae* e de *Escherichia coli* produtores de carbapenemases e outros apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos responsáveis por infeções do Hospital de Braga foram detetados no período compreendido entre Setembro de 2010 e Novembro de 2012, em diferentes produtos biológicos e diferentes serviços hospitalares. Na comunidade, residentes de lares de idosos e de UCCI do distrito de Braga, foram identificados como colonizados por *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos e isolado produtor de carbapenemase, em 2009 e 2012.

A deteção de genes codificadores de carbapenemases nos isolados que apresentam redução da suscetibilidade aos carbapenemos provenientes do hospital de Braga, permitiu identificar nove isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de IMP-22, um isolado de *Escherichia coli* produtor de IMP-2-like, dois isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de KPC-3 e um isolado de *Escherichia coli* produtor de KPC-3. Nos isolados de *Klebsiella pneumoniae* detetados como colonizadores fecais de residentes de lares de idosos e de UCCI, detetou-se um isolado de *Klebsiella pneumoniae* produtor de IMP-22 num residente da UCCI 3. Os resultados representam a primeira descrição dos genes *bla*_{IMP-22} e o gene *bla*_{KPC-3} em isolados de *Enterobacteriaceae* responsáveis por infeções num hospital e como colonizador fecal de um residente de uma UCCI, na região norte de Portugal (Gonçalves *et al*, 2012; Gonçalves *et al*, 2013a; Gonçalves *et al*, 2013b).

Os primeiros isolados de *Enterobacteriaceae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos no hospital de Braga, foram identificados em *Klebsiella pneumoniae* em Setembro de 2010, em amostras de urina e numa amostra de aspirado brônquico, provenientes da UCIP. Mais tarde, entre Maio e Julho de 2012, seis isolados de *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos foram identificados em diferentes serviços do hospital de Braga,

nomeadamente na UCIP (n=3), neurocirurgia (n=1) e medicina interna (n=2). Os isolados de *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos provenientes de colonização do trato intestinal de residentes de um lar de idosos e da UCCI 3, foram identificados em 2009 e em 2012, respectivamente. As duas instituições de prestação de cuidados de saúde à população idosa e/ou dependente apresentam relação de proximidade com o hospital de Braga podendo existir ligações na disseminação destes isolados, apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos.

Em alguns isolados de *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução de suscetibilidade aos carbapenemos provenientes do hospital de Braga e de colonização fecal não foram detetados genes codificadores de carbapenemases da classe A (*bla_{KPC}*), B (*bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{IMP-22}*, *bla_{NDM}*) e D (*bla_{OXA-48}*). Nestes isolados a redução da suscetibilidade aos carbapenemos poderá ser explicada pela presença de outros mecanismos justificando o fenótipo deste conjunto de isolados, como sejam a presença de genes codificadores de outras carbapenemases não abordadas no estudo, diminuição da permeabilidade da membrana externa e/ou mecanismo de efluxo. A redução da suscetibilidade ao ertapenemo em isolados de *Klebsiella pneumoniae* poderá ser explicada pela produção de ESBL do tipo CTX-M-15 com modificação da porina OmpK36 e OmpK35 como evidenciado em alguns estudos (Leavitt *et al*, 2009; Novais *et al*, 2012a; Poulou *et al*, 2013).

A descrição do gene *bla_{IMP-22}* em isolados de *Klebsiella pneumoniae* responsáveis por infeções no hospital de Braga e como colonizador fecal de um residente de uma UCCI, alerta para a disseminação de uma nova variante de MBL, correspondendo à primeira descrição mundial de IMP-22 em *Enterobacteriaceae* (Gonçalves *et al*, 2011; Gonçalves *et al*, 2012). Descrições do gene *bla_{IMP-22}* são frequentes em isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, mas em isolados de *Enterobacteriaceae* são poucas e recentes. As primeiras descrições do gene *bla_{IMP-22}* surgiram em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* em amostras ambientais e nos cuidados de saúde (Pellegrini *et al*, 2009; Duljasz *et al*, 2009) incluindo residentes de lares de idosos descritos num estudo na Áustria (Duljasz *et al*, 2009). Recentemente, em Espanha, surgem descrições do gene *bla_{IMP-22}* em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* (Viedma *et al*, 2012) e num surto por *Klebsiella pneumoniae* produtora de IMP-22 no hospital Puerta del Mar, Cadiz (Miró *et al*, 2013).

O primeiro isolado de *Klebsiella pneumoniae* produtor de IMP-22 foi identificado em Março de 2011, no hospital de Braga, numa amostra de hemocultura no serviço de medicina interna, seis meses após a identificação dos primeiros isolados de *Klebsiella*

pneumoniae com redução da suscetibilidade aos carbapenemos. Posteriormente, sete isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de IMP-22 foram identificados em diferentes produtos biológicos, provenientes dos serviços de medicina interna, urgência e urologia. A origem e transmissão de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de IMP-22 no hospital de Braga não são conhecidas. Os resultados sugerem a existência de uma fonte comum, o serviço de medicina interna, que poderá ter favorecido a disseminação de *Klebsiella pneumoniae* produtora de IMP-22. A identificação do primeiro isolado de *Klebsiella pneumoniae* produtor de IMP-22 teve origem num doente internado no serviço de medicina interna e os restantes doentes apresentam história de internamento prévio no referido serviço, inclusivé os doentes admitidos no serviço de urgência e da urologia. Informações individuais dos dois doentes admitidos no serviço de urgência permitiram verificar que após alta do serviço de medicina interna, um dos doentes foi para o domicílio e o segundo doente foi internado numa UCCI, no distrito de Braga, geograficamente próxima do hospital de Braga e contemplada no estudo de colonização fecal. Devido a complicações inerentes ao estado de saúde, estes doentes foram readmitidos no serviço de urgência da referida unidade hospitalar, na qual foram identificados estes isolados produtores de IMP-22. Nesta situação, a colonização por *Klebsiella pneumoniae* produtora de IMP-22 é uma hipótese a ser considerada, podendo representar um risco potencial para a disseminação destes produtores em ambientes extra-hospitalares, como as UCCI e na comunidade saudável, como é exemplo o domicílio.

A deteção de colonização fecal por *Klebsiella pneumoniae* produtora de IMP-22 num residente de uma UCCI refere a primeira descrição de colonização fecal por esta variante de MBL. O doente, com internamento recente na UCCI, apresenta história de internamento no serviço de medicina interna do hospital de Braga. A disseminação de IMP-22 no serviço de medicina interna do hospital de Braga é possível, como descrito anteriormente, com consequente colonização fecal dos doentes internados. Provavelmente, após alta hospitalar, o doente terá permanecido colonizado, apresentando risco de disseminação desta carbapenemase a outros residentes na UCCI, profissionais e comunidade, incluindo familiares. Colonização do trato intestinal por *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases em doentes internados em unidades hospitalares e em instituições de prestação de cuidados de saúde extra-hospitalares tem sido descrita em diversos países particularmente na Europa (Urban *et al*, 2008; Babouee *et al*, 2011; Benenson *et al*, 2012; Gijón *et al*, 2012; Prabaken *et al*, 2012). Colonização fecal por *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases em residentes de UCCI, podem contribuir para a disseminação nos cuidados agudos e diferenciados ou outras

instituições de prestação de cuidados de saúde, como acontece com produtores de ESBLs (Giani *et al*, 2009; Mills *et al*, 2011; Prabaken *et al*, 2012; Cascio *et al*, 2013; Feldman *et al*, 2013; Haraoui *et al*, 2013).

A avaliação das relações clonais dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de IMP-22 sugere a instalação bem-sucedida de um clone de *Klebsiella pneumoniae* produtor de IMP-22 no serviço de medicina interna do hospital de Braga. Pretende-se como tarefa futura, avaliar a relação clonal do isolado de *Klebsiella pneumoniae* produtor de IMP-22 do estudo de colonização fecal, com os isolados produtores de IMP-22 do hospital de Braga. O conhecimento epidemiológico de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases é importante para seleção terapêutica adequada e implementação de medidas de controlo de infeção. É de salientar a importância da deteção precoce destes isolados, como colonizadores do trato intestinal, nomeadamente aquando de admissão e alta hospitalar levantando sérios riscos de disseminação a diferentes ambientes e de desenvolvimento de infeção (Prabaker *et al*, 2012). Estas medidas são fundamentais para evitar a disseminação deste clone do serviço de medicina interna a outros serviços da unidade hospitalar e comunidade. A instalação bem-sucedida do clone de *Klebsiella pneumoniae* produtor de IMP-22 no ambiente hospitalar, nomeadamente no serviço de medicina interna, a que foi possível assistir desde Março de 2011, demonstra a importância de vigilância epidemiológica necessária para a prevenção de surtos por *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases. A transferibilidade do gene que a codifica, alerta para a hipótese de disseminação horizontal deste mecanismo de resistência a outros agentes patogénicos e para a hipótese de disseminação para a comunidade, pela alta de doentes colonizados.

Isolados de *Enterobacteriaceae* multirresistentes produtores de carbapenemases colocam problemas em termos de tratamento e de controlo de infeção em unidades hospitalares e em instituições de prestação de cuidados de saúde extra-hospitalar, como UCCI. A inadequação de metodologias de vigilância para a sua deteção pode comprometer a sua deteção precoce. Na deteção de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases a Direcção Geral da Saúde, sugeria a utilização de E-test para a determinação do *ratio* de CMI para o Imipenemo com e sem inibidor de MBLs, ineficaz na deteção destes isolados, pois a CMI em relação ao imipenemo é de suscetibilidade, demonstrando a necessidade de uma vigilância permanente para deteção da modificação dos perfis de resistência de isolados emergentes (Ministério da saúde, nº006/2010).

Este estudo descreve pela primeira vez num hospital da região norte de Portugal KPC-3 num isolado de *Escherichia coli* (Gonçalves *et al*, 2013) e posteriormente em dois isolados de *Klebsiella pneumoniae*. O primeiro isolado produtor de KPC-3 foi identificado

em *Escherichia coli* associado com a produção de IMP-2-like em Setembro de 2012 numa amostra de urina de um doente do sexo masculino com 86 anos, internado no serviço de medicina interna. Posteriormente, em Novembro de 2012, na UCIP e no serviço de medicina interna, foram identificados dois isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de KPC-3 que apresentam co-produção de ESBL. O primeiro isolado de *Klebsiella pneumoniae* foi identificado numa amostra de aspirado brônquico, num doente do sexo masculino de 38 anos, com história recente de internamento no hospital de Santa Maria, e consequente transferência para a UCIP do hospital de Braga. O segundo isolado de *Klebsiella pneumoniae* foi identificado numa amostra de urina, de um doente do sexo masculino de 84 anos, com encefalopatia hepática e insuficiência renal crónica, internado no serviço de medicina interna, proveniente de um lar de idosos do distrito de Braga, não contemplado no estudo de colonização fecal.

As descrições de isolados de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases do tipo KPC em Portugal ainda são poucas. Este estudo descreve, pela primeira vez, isolados clínicos de *Enterobacteriaceae* produtores de carbapenemases do tipo KPC, na região norte de Portugal. As recentes descrições de *Enterobacteriaceae* produtoras de KPC em Portugal demonstram os cuidados de saúde hospitalar e o ambiente, como nichos importantes de prováveis reservatórios de disseminação destes isolados. O gene *bla_{KPC-3}* foi identificado pela primeira vez em Portugal em 2009, num isolado de *Klebsiella pneumoniae* proveniente de um doente com leucemia internado no Centro Hospitalar Lisboa Norte, do grupo clonal ST11 (Machado *et al*, 2010; da Silva and Duarte, 2011). Recentemente foram isolados em quatro hospitais geograficamente distantes, identificados na sua maioria em amostras de urina de doentes com mais de 65 anos (Manageiro *et al*, 2012b). A nível ambiental, na região norte de Portugal um isolado de *Escherichia coli* produtora de KPC-2 foi identificado em amostras de águas de rio em Santo Tirso (Poirel *et al*, 2012a) e um isolado de *Kluyvera* spp produtora KPC-2 numa amostra proveniente de uma ETAR do distrito do Porto (Cecílio *et al*, 2013).

Enterobacteriaceae produtoras de KPC têm vindo a aumentar de forma alarmante a nível mundial, particularmente associadas à prestação de cuidados de saúde. Isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de KPC-3 têm sido descritos em isolados responsáveis por infeções e em estudos de colonização em instituições de prestação de cuidados de saúde e na comunidade. *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC-3 foi identificada em isolados responsáveis por infeções e em isolados de colonização pela primeira vez no hospital Ramon e Cajal, Madrid, num estudo realizado entre Setembro de 2009 e Fevereiro de 2010 (Robustillo Rodela *et al*, 2012). Também no mesmo ano, um estudo descreve 12 isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de KPC-3 em isolados

clínicos de 8 doentes recolhidos entre Setembro de 2009 e Fevereiro de 2010 em Madrid (Curiao *et al*, 2010). No Canadá o primeiro isolado de *Enterobacteriaceae* produtor de KPC-3 foi identificado em 2009 (Denisuik *et al*, 2013; Leung *et al*, 2012). No último ano, infeções por *Enterobacteriaceae* produtoras de KPC-3, particularmente em unidades hospitalares tem vindo a aumentar de forma alarmante (Woodford *et al*, 2004a, Pulcrano *et al*, 2013; Ruiz-Garbajosa *et al*, 2013; Samra *et al*, 2013).

Os resultados deste estudo deixam-nos alerta para o aparecimento de mais isolados de *Enterobacteriaceae* produtoras de KPC-3 e possível disseminação à comunidade. Após alta hospitalar estes doentes podem estar colonizados por estes bacilos de Gram negativo multirresistentes e disseminarem à comunidade e em residentes de lares de idosos ou de outras instituições, por analogia com o demonstrado com os isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de IMP-22. A realizar no futuro, pretende-se verificar se o isolado de *Escherichia coli* produtor de KPC-3 é do grupo clonal ST131, ainda pouco descrito em produtores de carbapenemases (Naas *et al*, 2011; Morris *et al*, 2011; Cuzon *et al*, 2013). Assim como, estudar o ST dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de KPC-3 e comparar com os isolados identificados em Portugal e internacionais.

O aparecimento de isolados de *Klebsiella pneumoniae* e de *Escherichia coli* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos no hospital de Braga, pode estar relacionado com o aumento do consumo de carbapenemos, que se verificou a partir de 2008. O consumo de carbapenemos na unidade hospitalar é provavelmente reflexo do aumento de infeções por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs. No ano de 2010, registou-se a maior quantidade de carbapenemos utilizados no hospital de Braga, particularmente de meropenemo (18218 unidades), correspondendo ao ano, em que se identificou o primeiro isolado de *Klebsiella pneumoniae* produtora de IMP-22. O consumo de carbapenemos foi muito significativo nos serviços de medicina interna, cirurgia, ortopedia e urologia. No serviço de neurocirurgia a situação foi inversa, com diminuição do consumo destes antibióticos β -lactâmicos (informação pessoal dos Serviços Farmacêuticos e laboratório de Microbiologia do hospital de Braga, com base em dados estatísticos dos serviços, não publicados). O lar de idosos 7 e a UCCI 3 apresentam relação com o hospital de Braga, podendo a transferência de doentes entre as diferentes tipologias de cuidados de saúde facilitar a disseminação.

A vigilância epidemiológica actual de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases deve fazer parte de programas nacionais de vigilância em isolados responsáveis por infeções e em colonização fecal para controlo da disseminação nos cuidados de saúde e na comunidade. A norma nº004 de 2013 da Direção-Geral da Saúde

visa a notificação obrigatória de *Enterobacteriaceae* com resistência intermédia ou resistência aos carbapenemos e/ou presumíveis produtoras de carbapenemases. Este programa de vigilância epidemiológica nacional permite fundamentar a implementação de uma política de prescrição de antibióticos adequada e medidas de prevenção de disseminação rigorosas (Ministério da Saúde, 2013).

Colonização fecal e infeção por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e de Carbapenemases: uma realidade na região norte de Portugal

A disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e de carbapenemases ocorre de forma alarmante em todo o Mundo, representando um problema de saúde pública emergente e complexo. Mudanças epidemiológicas sentidas recentemente com a disseminação de clones pandémicos e virulentos de *Escherichia coli* produtora de CTX-M-15, como é exemplo o grupo clonal O25b-ST131, e *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases para os quais a prestação de cuidados à população idosa e/ou dependente parecem contribuir de forma relevante, impõem a necessidade urgente de abordagens terapêuticas adequadas, medidas de controlo de infeção e vigilância epidemiológica.

A colonização intestinal por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e de carbapenemases num grupo da população que utiliza com frequência instituições de prestação de cuidados de saúde, como as unidades hospitalares e instituições na comunidade, direccionadas para questões inerentes ao apoio social e cuidados de saúde, nomeadamente lares de idosos e UCCI, é fundamental para compreender o cenário actual em Portugal e identificar possíveis reservatórios destes bacilos de Gram negativo multirresistentes aos antibióticos. O estado de saúde e situações de dependência da população, particularmente a população idosa, condiciona a frequente utilização dos cuidados de saúde existentes, como sendo os cuidados hospitalares, cuidados primários, cuidados em instituições de apoio social e de prestação de cuidados de saúde como lares de idosos e UCCI e os cuidados no domicílio. Lares de idosos, cada vez mais adaptados às necessidades dos residentes e UCCI em Portugal, parecem ter favorecido a disseminação de *Enterobacteriaceae* multirresistente aos antibióticos, por questões inerentes ao convívio social, prestação de cuidados de saúde com proximidade dos residentes e evidenciando características similares às unidades de internamento hospitalar, e por alterações fisiopatológicas dos mais idosos e/ou dependentes com necessidade de mais intervenções de cuidados de saúde.

Instituições extra-hospitalares, como lares de idosos e UCCI, caracterizam-se por um ambiente promotor do aparecimento de bactérias resistentes aos antibióticos, resultado de características inerentes à aglomeração física num espaço limitado, elevado número de doentes idosos e com diferentes patologias, utilização frequente de antibióticos durante processo terapêutico e técnicas e dispositivos invasivos de tratamento (McClean *et al*, 2011). O nosso trabalho demonstra como são relevantes os cuidados de saúde hospitalares e os existentes na comunidade, na disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e de carbapenemases, numa fase marcada pela proliferação de instituições de prestação de cuidados de saúde a este nicho da população como as UCCI e na adaptação de instituições já existentes, para prestação de cuidados de saúde, na região norte de Portugal.

O trato intestinal de residentes idosos e/ou dependentes de lares de idosos e de UCCI da região norte do País, parece funcionar como importante reservatório de isolados de *Escherichia coli* produtora de ESBL do tipo CTX-M grupo 1, possivelmente CTX-M-15, do grupo clonal O25b-ST131, multirresistentes aos antibióticos, particularmente aos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, e virulentos, e de isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtora de TEM, OXA e CTX-M grupo 1. Esta população pode contribuir para a disseminação de *Enterobacteriaceae* multirresistentes aos antibióticos no ambiente intra-institucional e consequentemente desenvolvimento de infeção em doentes vulneráveis internados nestas unidades (March *et al*, 2010; Birgand *et al*, 2013). Isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBLs foram demonstrados nos isolados responsáveis por infeções do hospital de Braga, num grupo da população idosa e/ou dependente, evidenciando características fenotípicas e genotípicas similares.

Os isolados com redução da suscetibilidade aos carbapenemos e produtores de carbapenemases do tipo IMP-22 e KPC-3 foram identificados maioritariamente em doentes idosos. A identificação de *Klebsiella pneumoniae* produtora de IMP-22 nos cuidados de saúde agudos e diferenciados e na comunidade como colonizador intestinal, alerta para a disseminação destes produtores nesta região, como aconteceu com *Escherichia coli* produtora de ESBL do grupo clonal O25b-ST131.

Os isolados responsáveis por infeções produtores de ESBLs e de carbapenemases provenientes do hospital de Braga foram identificados de forma relevante na população idosa e dependente residente no domicílio, o que levanta questões para a possível colonização fecal por estes bacilos de Gram negativo multirresistentes aos antibióticos e possível disseminação a diferentes nichos. O contacto permanente com cuidadores e profissionais de saúde de instituições que extra-

hospitalares e de apoio domiciliário, que em muitas situações colaboram profissionalmente em unidades hospitalares, é um fator de risco importante inerente à disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e de carbapenemases (March *et al*, 2010; McClean *et al*, 2011).

No sentido de tentar ilustrar interações entre diferentes tipologias de cuidados de saúde vocacionadas à população idosa e/ou dependente, a Figura 28 evidencia o possível modelo de disseminação de *Enterobacteriaceae* multirresistentes aos antibióticos, na região norte de Portugal, demonstrando:

1. Dispersão geográfica de *Escherichia coli* produtora de CTX-M grupo 1 do grupo clonal O25b-ST131, em isolados comensais comum nas instituições com maior número de residentes dependentes de cuidados de saúde do distrito de Braga e Porto, e em isolados responsáveis por infeções do hospital de Braga.
2. *Klebsiella pneumoniae* em isolados comensais e de infeção com perfil de β -lactamases, TEM, OXA e CTX-M grupo 1, como em isolados de *Escherichia coli*, em instituições extra-hospitalares com relação com o hospital de Braga, lar de idosos 1, UCCI 1 e UCCI 3.
3. Disseminação de *Klebsiella pneumoniae* com redução da suscetibilidade aos carbapenemos intra e extra-hospitalar. Estes isolados foram detetados em instituições extra-hospitalares, lar de idoso 7 e UCCI 3, próximas, do hospital de Braga.
4. Disseminação de *Klebsiella pneumoniae* produtora de IMP-22 intra-hospitalar e extra-hospitalar, demonstrando a relação da UCCI 3 inerente à admissão de doentes provenientes do hospital de Braga, provavelmente colonizados.
5. Disseminação intra-hospitalar de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC-3 e possível transmissão horizontal de KPC-3 a avaliar futuramente.

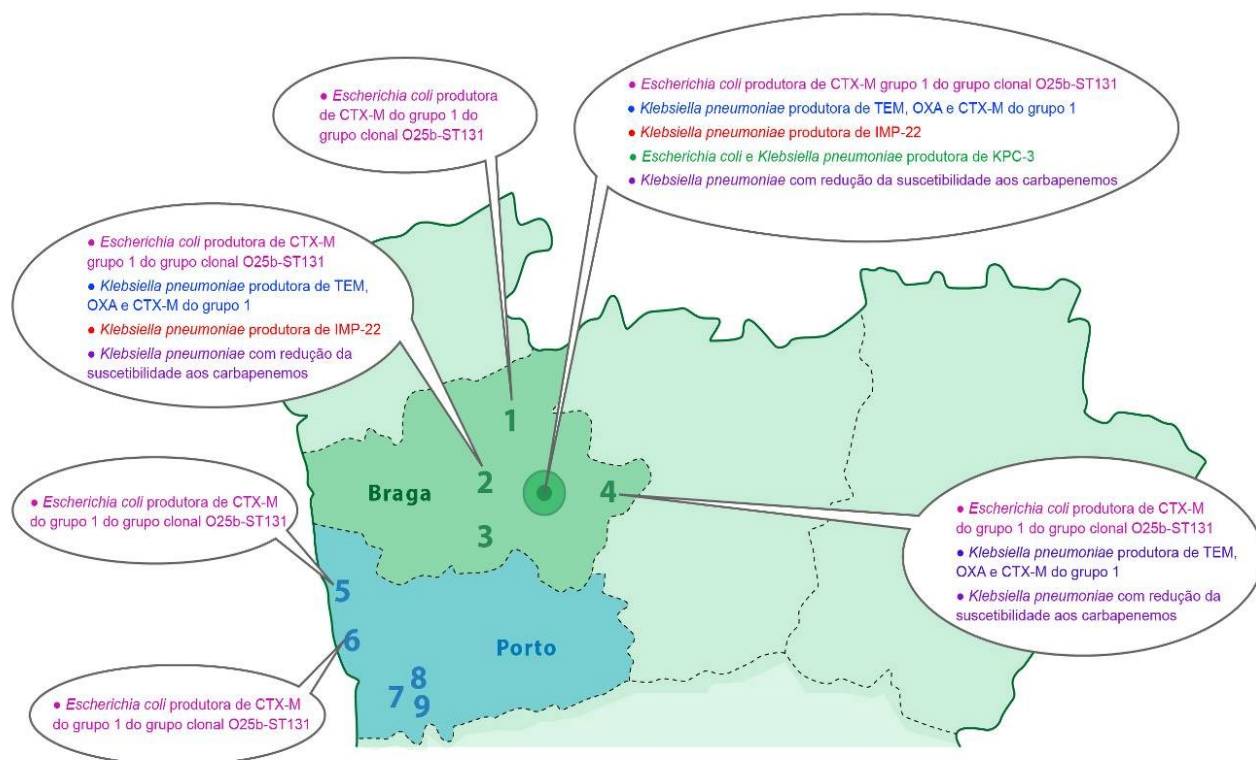


Figura 28 – Detecção de relações geográficas dos isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs e de Carbapenemases em diferentes instituições de prestação de cuidados de saúde na região norte de Portugal.

Legenda: 1- UCCI-2; 2 - UCCCCI-3; 3 - Lar de idosos 3; 4 - UCCI 1 e Lar de idosos 7; 5 - Lar de idosos 5; 6 - Lar de idosos 6; 7 - Lar de idosos 1; 8 - Lar de idosos 2; 9 - Lar de idosos 4; - ● hospital de Braga

O hospital de Braga é a unidade hospitalar de referência desta região, que se destina à prestação de cuidados à população, do domicílio e de outras instituições de cuidados de saúde, hospitalares e extra-hospitalares do distrito de Braga e Viana do Castelo. Em situação de alta hospitalar, sempre que possível, os doentes e equipas de gestão de alta hospitalar, selecionam UCCI próximas da área de residência para continuação de prestação de cuidados de saúde, quando necessário. As três UCCI do distrito de Braga, geograficamente próximas do hospital de Braga, particularmente a UCCI 3, apresentam relação com a unidade hospitalar inerente à referenciação de doentes, em situação de agudização e de admissão nestas unidades, com admissão de doentes, na sua maioria desta unidade hospitalar. A análise da proveniência dos doentes, antes da admissão nas UCCI, feita para a UCCI 3, foi importante para relacionar com a origem dos doentes. Na UCCI 3 foram admitidos doentes do hospital de Braga, de outras

UCCI nomeadamente do distrito de Porto, provenientes de uma instituição abordada no estudo de colonização fecal em 2008, lar de idosos 5, atualmente UCCI, e do domicílio, podendo esta situação ser transversal à UCCI 1 e à UCCI 2. Isolados de *Escherichia coli* produtora de ESBL do tipo CTX-M do grupo 1 com o mesmo perfil de PFGE, isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtora de TEM, OXA e CTX-M grupo 1 com o mesmo PFGE, *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos e produtora de IMP-22 foram detadas em instituições extra-hospitalares próximas do hospital de Braga, evidenciando a ligação entre estas unidades e a referida unidade hospitalar. A UCCI 3, UCCI 1 e lar de idosos 7 são as principais instituições extra-hospitalares, próximas do hospital de Braga e com relação na admissão e encaminhamento de doentes em situação aguda, podendo justificar os resultados de colonização intestinal. A UCCI 2, embora geograficamente próxima do hospital de Braga, apresenta menor relação relativamente à admissão hospitalar, devido à existência de unidade hospitalar na mesma instituição que a UCCI. No entanto, doentes internados no hospital de Braga podem ser admitidos nesta UCCI, após alta hospitalar, podendo estar colonizados. O hospital de Braga parece representar um papel fundamental na disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e de Carbapenemases para as instituições extra-hospitalares. Nas instituições mais afastadas do hospital de Braga, nomeadamente lares de idosos do centro do Porto e no lar de idosos 3 do distrito Braga, não foram detetados estes bacilos de Gram negativo multirresistentes aos antibióticos. Esta condição provavelmente deve-se ao grau de independência dos residentes destas instituições, com menos e/ou ausência de prestação de cuidados de saúde, e menos situações de internamento em unidades hospitalares.

Os resultados deste trabalho alertam para a possível disseminação de *Enterobacteriaceae* multirresistentes aos antibióticos em instituições extra-hospitalares, e possível disseminação a diferentes instituições extra-hospitalares e/ou hospitalares, através de doentes colonizados, na sua maioria idosos e dependentes de cuidados de saúde. As constantes admissões e re-admissões nas diferentes instituições de prestação de cuidados de saúde da população mais dependente de cuidados de saúde, residentes de instituições de cuidados extra-hospitalares e/ou no domicílio é um ciclo contínuo de mobilidade de um grupo da população, maioritariamente idosos que utilizam com frequência os cuidados de saúde. Neste sentido, esta circulação no setor dos cuidados de saúde, organizado para responder às necessidades da população com respostas intermédias na comunidade e racionalização dos cuidados hospitalares, parece favorecer a disseminação de *Enterobacteriaceae* multirresistentes aos antibióticos. As diferentes tipologias de prestação de cuidados de saúde parecem apresentar relação na

disseminação de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBLs e de carbapenemases, resultado da mobilidade de um grupo da população que utiliza com frequência os cuidados de saúde. A população idosa e/ou dependente, que utiliza frequentemente instituições de prestação de cuidados de saúde como sendo cuidados agudos e diferenciados, UCCI, lares de idosos e cuidados no domicílio (Mody, 2007; MacPherson *et al*, 2009; March *et al*, 2010; Gruber *et al*, 2013), podendo condicionar a ecologia de bacilos de Gram negativo multirresistentes aos antibióticos nas instituições de cuidados de saúde, particularmente nas instituições extra-hospitalares podendo constituir um risco para a segurança dos doentes.

A colonização fecal neste segmento da população, constitui uma forma silenciosa, de entrada e/ou (re)-introdução de bacilos de Gram negativo multirresistentes aos antibióticos nos cuidados agudos e diferenciados e em outras instituições de prestação de cuidados de saúde, que pode contribuir para a instalação de surtos na prestação de cuidados de saúde e dificultara o tratamento de infeções na comunidade (Gruben *et al*, 2013). Admissões frequentes, com internamentos e transferência, nas diferentes tipologias de cuidados de saúde, inerente a patologias típicas da população idosa e/ou dependente, parecem facilitar a disseminação destes bacilos de Gram negativo multirresistentes aos antibióticos, contribuindo para a disseminação intra-institucional e comunidade, incluindo a familiares, crianças, cuidadores e disseminação no apoio domiciliário. Esta situação promove a criação de um ciclo de disseminação complexo e dinâmico, inerente à disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e de carbapenemases. Neste sentido, a população institucionalizada em lares de idosos e UCCIs, assim como a população idosa e/ou dependente residente no domicílio (Birgand *et al*, 2013) devem ser consideradas como população de elevado risco na disseminação de bactérias multirresistentes aos antibióticos na admissão em unidades hospitalares e outras tipologias de cuidados de saúde (Bonomo *et al*, 2003; Mody, 2007; March *et al*, 2010; Birgand *et al*, 2013; Gruber *et al*, 201; Löhr *et al*, 2013).

Este trabalho demonstrou evolução cronológica do tipo de β -lactamases, das ESBLs às Carbapenemases, presentes em isolados multirresistentes de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* responsáveis por infeção e colonização, no ambiente hospitalar e em instituições de prestação de cuidados de saúde extra-hospitalares responsáveis pela prestação de cuidados sociais e de saúde na população maioritariamente idosa, numa região do norte de Portugal (Figura 29). A deteção de *Klebsiella pneumoniae* apresentando redução da suscetibilidade aos carbapenemos em isolados de infeção e comensais, alertou para o início de um novo ciclo de disseminação de produtores de

carbapenemases, confirmado em 2011 em isolados responsáveis por infecção do hospital de Braga e em 2012 em isolados comensais, que parece ser semelhante ao das ESBLs.

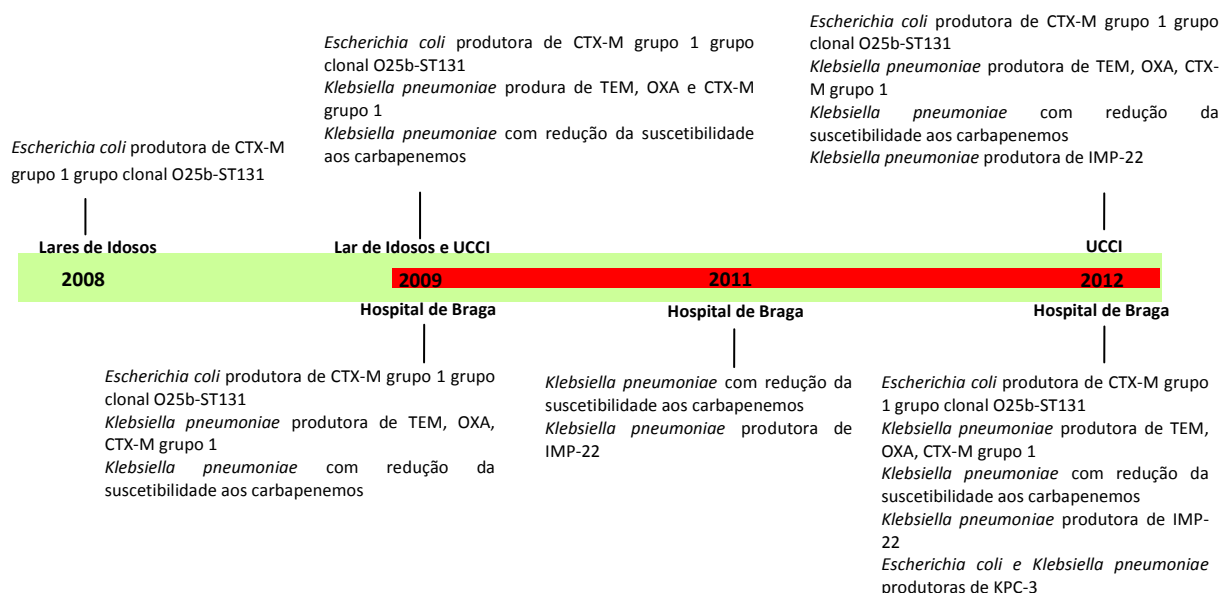


Figura 29 - Evolução temporal do aparecimento de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBLs e Carbapenemases em isolados comensais e responsáveis por infeções na região norte de Portugal

O aparecimento destas β -lactamases parece acompanhar situações de maior dependência e vulnerabilidade de residentes institucionalizados em unidades de prestação de cuidados de saúde extra-hospitalares, internados e do domicílio, admitidos numa unidade hospitalar. A relevância dos resultados de colonização fecal em residentes de instituições de apoio social e de cuidados de saúde extra-hospitalares, assim como os isolados responsáveis por infeções, poderão alertar para a possível colonização de profissionais, superfícies e materiais de prestação de cuidados de saúde.

A deteção precoce destes bacilos de Gram negativo multirresistentes aos antibióticos com rastreio de colonização intestinal, parece constituir uma medida fundamental de controlo de infeção, a implementar nas instituições de prestação de cuidados de saúde para grupos de risco de população idosa institucionalizada. A criação de abordagens de deteção de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e de carbapenemases em populações de risco, como é a população idosa e/ou dependente, na admissão em unidades hospitalares e em unidades de apoio social e de prestação de cuidados de saúde na comunidade, é fundamental para inverter a tendência de disseminação destes bacilos de Gram negativo associados a clones multirresistentes aos

antibióticos e virulentos, nos cuidados de saúde e reduzir as infeções adquiridas na prestação de cuidados de saúde. Medidas de controlo de infeção são imprescindíveis neste nicho da população institucionalizada em unidades de prestação de cuidados de saúde e residente no domicílio (Oteo *et al*, 2006; March *et al*, 2010; Viau *et al*, 2012), como (re)-educação dos profissionais de cuidados de saúde, lavagem das mãos, utilização de batas e aventais, utilização adequada dos antibióticos e vigilância contínua (March *et al*, 2010; Utsumi *et al*, 2010; McClean *et al*, 2011; Gruber *et al*, 2013; Han *et al*, 2013). Estas medidas de controlo de infeção apesar de nem sempre serem de fácil aplicação, pelos recursos limitados de algumas instituições extra-hospitalares, comparativamente com às instituições de cuidados agudos e diferenciados (Han *et al*, 2013), existência de diversos cuidadores de saúde e/ou em número reduzido (Stuart *et al*, 2011), são essenciais para impedir o desenvolvimento de infeções associadas aos cuidados de saúde e colonização por bacilos de Gram negativo multirresistentes aos antibióticos (March *et al*, 2010; Birgand *et al*, 2013; Prabaker *et al*, 2012), em instituições onde o contacto entre residentes é frequente, longos períodos de internamento e utilização de antibióticos, muitas vezes de forma inadequada (Han *et al*, 2013).

De acordo com a circular normativa nº17 de 2007 da Direcção-Geral de Saúde, a transferência de residentes de UCCI, colonizados ou com infeção por bactérias multirresistentes aos antibióticos deve ser acompanhada de informação prévia sobre a bactéria em causa, local de isolamento e antibiograma. Esta medida é essencial de forma a implementar medidas de controlo de infeção na admissão nos cuidados agudos e diferenciados que minimizem o risco de infeção cruzada. Segundo a mesma circular normativa, não são admitidos doentes nas UCCI da RNCCI com infeção por bactérias multirresistentes aos antibióticos e com tratamento com antibióticos de uso hospitalar. Considera-se fundamental na admissão em UCCI e em lares de idosos, como demonstrado nos resultados deste estudo e pelas características de cuidados de saúde que apresentam estas instituições, que situações de colonização por bactérias multirresistentes aos antibióticos como *Escherichia coli* do clone O25b-ST131 e *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL de carbapenemase, sejam consideradas na admissão a instituições de prestação de cuidados de saúde extra-hospitalares.

Isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL do tipo CTX-M, com evolução para o aparecimento de carbapenemases, responsáveis por infeções e em colonização fecal, parecem estar relacionados com a população idosa e/ou dependente como demonstrado neste estudo. Estes resultados inerentes a instituições de prestação de cuidados de saúde numa região específica do País, ainda pouco estudada, poderão espelhar situações semelhantes de disseminação destes bacilos de Gram

negativo multirresistentes aos antibióticos, em instituições semelhantes às abordadas no estudo em outras regiões em Portugal, vocacionadas aos cuidados de saúde a este grupo da população. O conhecimento da realidade desta região poderá contribuir para controlos de disseminação regional, uma vez que as relações entre os vários tipos de prestação de cuidados parecem demonstrar interações responsáveis pela dinâmica complexa de disseminação de isolados de *Enterobacteriaceae* multirresistentes aos antibióticos. Estratégias de controlo de infeção orientadas segundo um modelo organizado entre as diferentes instituições de prestação de cuidados de saúde nesta região do País, com identificação de doentes com infeção ou colonizados por *Enterobacteriaceae* multirresistentes aos antibióticos poderão representar uma medida fundamental de forma a quebrar o ciclo de disseminação destes isolados multirresistentes aos antibióticos.

Conclusões

Este estudo ilustra a disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e de carbapenemases como colonizadoras fecais de instituições de prestação de cuidados de saúde na comunidade e em isolados responsáveis por infecções do hospital de Braga, com influência da população idosa e/ou dependente:

- **Disseminação de *Escherichia coli* produtora de CTX-M grupo 1, provavelmente CTX-M-15 do grupo clonal pandémico e virulento O25b-ST131** na prestação de cuidados de saúde agudos e diferenciados responsáveis por infecções e como colonizador fecal em residentes de instituições de prestação de cuidados de saúde na comunidade, lares de idosos e UCCI. Os isolados de *Escherichia coli* de colonização intestinal evidenciam características de resistência, filogenéticas e de virulência típicas de isolados de *Escherichia coli* uropatogénicos, associados à linhagem clonal O25b-ST131 bem sucedida nesta região e emergente. Isolados de *Escherichia coli* de colonização fecal e responsáveis por infecções, com características fenotípicas, moleculares e genes de virulência similares foram identificados no mesmo perfil de PFGE, sugerindo disseminação clonal. A mobilidade da população idosa e/ou dependente de cuidados de saúde pode favorecer esta situação através da frequente admissão e/ou internamento nas diferentes tipologias de cuidados de saúde, como evidenciado nesta região do País, neste trabalho.

- ***Klebsiella pneumoniae* produtora de β -lactamases TEM, OXA e ESBL do tipo CTX-M grupo 1 com o mesmo perfil de PFGE** na colonização fecal de residentes de instituições de prestação de cuidados de saúde na comunidade, lares de idosos e UCCI e na prestação de cuidados agudos e diferenciados, em diferentes serviços, incluindo unidade de cuidados de neonatologia, alertam para a disseminação de isolados multirresistentes aos antibióticos, do mesmo clone, nas diferentes tipologias de prestação de cuidados de saúde. A deteção destes isolados parece demonstrar a disseminação clonal entre diferentes unidades de prestação de cuidados de saúde, favorecida pela transferência de doentes e possivelmente por profissionais de saúde.

- ***Klebsiella pneumoniae* produtora de IMP-22 em isolados responsáveis por infeção e em colonização intestinal** descrita pela primeira vez. Isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de IMP-22 foram detetados em isolados responsáveis por

infecções em doentes internados no serviço de medicina interna, urologia e admitidos no serviço de urgência, tendo-se verificado a instalação bem sucedida no serviço de medicina interna. *Klebsiella pneumoniae* produtora de IMP-22 foi detetada como colonizadora fecal de um residente de uma UCCI, próxima da unidade hospitalar e com história de internamento no serviço de medicina interna da referida unidade hospitalar. A deteção desta nova metalo- β -lactamase, IMP-22 em *Klebsiella pneumoniae*, alerta para a necessidade de adequação de vigilância epidemiológica para evitar a disseminação e instalação de surtos nas diferentes tipologias de cuidados de saúde. A transferibilidade por conjugação do gene *bla*_{IMP-22} alerta para a hipótese de disseminação deste mecanismo de resistência a outros agentes patogénicos.

- Primeira descrição de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC-3 em isolados responsáveis por infeções no hospital de Braga alertando para esta nova realidade na zona Norte do País.

As interacções inerentes à disseminação de *Enterobacteriaceae* multirresistentes aos antibióticos em diferentes instituições de prestação de cuidados de saúde segundo um modelo regional, parecem ser influenciadas pela população idosa e/ou dependente como evidenciado neste estudo. Esta população deve ser considerada como grupo de risco aquando de admissão em instituições de prestação de cuidados de saúde. O rastreio de colonização fecal por estes bacilos de Gram negativo multirresistentes aos antibióticos neste grupo da população, parece representar uma medida importante para controlo de infeção na prestação de cuidados de saúde.

Perspetivas Futuras

Abordagem molecular:

- **Caracterização molecular para confirmação da hipótese de CTX-M-15** como mais provável representante das β -lactamases CTX-M grupo 1.
- **Caracterização dos isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* por MLST**, e posterior comparação com estudos internacionais.
- **Estudo da permeabilidade da membrana externa e outros mecanismos de resistência** em isolados de *Klebsiella pneumoniae* que possam justificar a redução da suscetibilidade aos carbapenemos.

No sentido de aprofundar a importância da colonização fecal por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e produtores de carbapenemases e o contributo para a disseminação nos cuidados de saúde, particularmente à população idosa e crianças em Portugal, são delineadas as seguintes linhas de investigação a estudar em trabalhos futuros. O conhecimento desta realidade com a identificação de reservatórios pode contribuir para a limitação destes ciclos de disseminação cada vez, mais complexos.

- **Estudo da colonização fecal da população residente no domicílio, dependente de cuidados de saúde:** os resultados da caracterização dos isolados de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs e de carbapenemases de infeções do hospital de Braga, alertam para a existência na comunidade, nomeadamente no domicílio, de pessoas idosas e/ou dependentes de cuidados de saúde admitidos com frequência na unidade hospitalar, em situações de agudização da situação clínica e/ou intervenções clínicas programadas. A população dependente residente no domicílio poderá contribuir para a disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e de carbapenemases na comunidade saudável e (re)introdução destes bacilos de Gram negativo na unidade hospitalar.

- **Estudo de colonização fecal em crianças e idosos que compartilham a mesma instituição:** os cuidados à população idosa e/ou dependente associada na mesma instituição aos cuidados infantis, não é uma realidade nova no nosso País. Na realização do estudo de colonização fecal verificámos que existem instituições vocacionadas para

os dois cuidados, contribuindo para convivência próxima entre estas duas faixas etárias da nossa população. Estarão os idosos a contribuir para a disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e de carbapenemases para as crianças?

- Avaliação da colonização cutânea e intestinal em profissionais de instituições de prestação de cuidados de saúde e cuidadores no domicílio: profissionais e cuidadores de cuidados de saúde apresentam risco de colonização por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e/ou carbapenemases devido ao maior contacto com os doentes, na realização de procedimentos de cuidados como higiene, alimentação e transferência. Profissionais e cuidadores poderão contribuir para a disseminação destes bacilos de Gram negativo multirresistentes aos antibióticos a outros doentes institucionalizados, no domicílio e à comunidade.

- Caracterização dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* com redução da suscetibilidade aos carbapenemos como colonizadores fecais de residentes de lares de idosos e de UCCI e isolados de infeções do hospital de Braga: O estudo permitiu identificar o gene *bla*_{IMP-22}, pela primeira vez em isolados de *Klebsiella pneumoniae* no hospital de Braga. Verificar se os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* com redução da suscetibilidade aos carbapenemos são produtores de IMP-22, poderá ajudar a interpretar a deteção desta MBL em isolados de *Klebsiella pneumoniae*.

Referências Bibliográficas

Abreu Nogueira, J. M. Cuidados Continuados – Desafios. Unidade de Missão para os Cuidados Continuados Integrados; 2009.

Adler A, Carmeli Y. Dissemination of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in the health care settings: tracking the trails of an elusive offender. MBio. 2011; **20**:2(6). pii: e00280-11.

Alekshun MN, Levy SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. Cell. 2007; **23**:128(6):1037-50.

Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. Nat Rev Microbiol. 2010; **8**(4):251-9.

Andersson DI, Hughes D. Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. Drug Resist Updat. 2012; **15**(3):162-72.

Arpin C, Dubois V, Coulange L, André C, Fischer I, Noury P, Grobost F, Brochet JP, Jullin J, Dutilh B, Larribet G, Lagrange I, Quentin C. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in community and private health care centers. Antimicrob Agents Chemother. 2003; **47**(11):3506-14.

Arvand M, Moser V, Pfeifer Y. Prevalence of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* and spread of the epidemic clonal lineage ST131 in nursing homes in Hesse, Germany. J Antimicrob Chemother. 2013; **68**(11):2686-8.

Babic M, Hujer AM, Bonomo RA. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. Drug Resist Updat. 2006; **9**(3):142-56.

Babouee B, Widmer AF, Dubuis O, Ciardo D, Droz S, Betsch BY, Garzoni C, Führer U, Battegay M, Frei R, Goldenberger D. Emergence of four cases of KPC-2 and KPC-3-carrying *Klebsiella pneumoniae* introduced to Switzerland, 2009-10. Euro Surveill. 2011; **17**; **16**(11), pii: 19817.

Banerjee R, Johnson JR. *Escherichia coli* ST131: variations on a theme of clonal expansion. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013; **31**(6):355-6.

Banerjee R, Johnston B, Lohse C, Porter SB, Clabots C, Johnson JR. *Escherichia coli* sequence type 131 is a dominant, antimicrobial-resistant clonal group associated with healthcare and elderly hosts. Infect Control Hosp Epidemiol. 2013; **34**(4):361-9.

- Baquero F, Coque TM, de la Cruz F.** Ecology and evolution as targets: the need for novel eco-evo drugs and strategies to fight antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; **55**(8):3649-60.
- Baquero F, Martínez JL, Cantón R.** Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol.* 2008;**19**(3):260-5.
- Baquero F, Nombela C.** The microbiome as a human organ. *Clin Microbiol Infect.* 2012; **18**, Suppl 4:2-4.
- Baquero F.** Metagenomic epidemiology: a public health need for the control of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012; **18** Suppl 4:67-73.
- Baraniak A, Izdebski R, Fiett J, Sadowy E, Adler A, Kazma M, Salomon J, Lawrence C, Rossini A, Salvia A, Vidal Samso J, Fierro J, Paul M, Lerman Y, Malhotra-Kumar S, Lammens C, Goossens H, Hryniewicz W, Brun-Buisson C, Carmeli Y, Gniadkowski M; MOSAR WP2 and WP5 Study Groups.** Comparative population analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum β -lactamases colonizing patients in rehabilitation centers in four countries. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; **57**(4):1992-7.
- Barber AE, Norton JP, Spivak AM, Mulvey MA.** Urinary tract infections: current and emerging management strategies. *Clin Infect Dis.* 2013; **57**(5):719-24.
- Bassetti M, Ginocchio F, Mikulska M.** New treatment options against gram-negative organisms. *Crit Care.* 2011; **15**(2):215.
- Beceiro A, Tomás M, Bou G.** Antimicrobial resistance and virulence: a beneficial relationship for the microbial world?. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012; **30**(8):492-9.
- Ben-Ami R, Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Schwartz D, Giladi M, Chmelnitsky I, Leavitt A, Carmeli Y.** Influx of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* into the hospital. *Clin Infect Dis.* 2006; **42**(7):925-34.
- Benenson S, Warburg G, Hidalgo-Grass C, Temper V, Moses AE, Block C, Strahilevitz J.** Comparison of two carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones: from a contained outbreak in a paediatric population and from a national epidemic. *J Antimicrob Chemother.* 2012; **67**(7):1651-4.
- Bertrand X, Amara M, Sauget M, Clément MC, Talon D, Domelier-Valentin AS, Quentin R, van der Mee-Marquet N; Réseau des Hygiénistes du Centre.** Extended-

spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: unexpected low prevalence of carriage in elderly French residents. *Age Ageing*. 2012; **41**(2):233-7.

Birgand G, Armand-Lefevre L, Lolom I, Ruppe E, Andreumont A, Lucet JC. Duration of colonization by extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* after hospital discharge. *Am J Infect Control*. 2013;**41**(5):443-7.

Birgy A, Bidet P, Genel N, Doit C, Decré D, Arlet G, Bingen E. Phenotypic screening of carbapenemases and associated β -lactamases in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*. 2012; **50**(4):1295-302.

Blanco J, Mora A, Mamani R, López C, Blanco M, Dahbi G, Herrera A, Marzoa J, Fernández V, de la Cruz F, Martínez-Martínez L, Alonso MP, Nicolas-Chanoine MH, Johnson JR, Johnston B, López-Cerero L, Pascual A, Rodríguez-Baño J; Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH). Four main virotypes among extended-spectrum- β -lactamase-producing isolates of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131: bacterial, epidemiological, and clinical characteristics. *J Clin Microbiol*. 2013; **51**(10):3358-67.

Blanco M, Alonso MP, Nicolas-Chanoine MH, Dahbi G, Mora A, Blanco JE, López C, Cortés P, Llagostera M, Leflon-Guibout V, Puentes B, Mamani R, Herrera A, Coira MA, García-Garrote F, Pita JM, Blanco J. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum {beta}-lactamases in Lugo (Spain): dissemination of clone O25b:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother*. 2009;**63**(6):1135-41.

Bonfim C, Garrid MM, Saraiva ME, Veiga, SM. Lar para Idosos. Direção-Geral da Acção Social; 1996.

Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; **48**(1):1-14.

Bonomo RA, Donskey CJ, Blumer JL, Hujer AM, Høyenm CK, Jacobs MR, Whalen CC, Salata RA. Cefotaxime-resistant bacteria colonizing older people admitted to an acute care hospital. *J Am Geriatr Soc*. 2003; **51**(4):519-22.

Bonomo RA. Multiple antibiotic-resistant bacteria in long-term-care facilities: An emerging problem in the practice of infectious diseases. *Clin Infect Dis*. 2000; **31**(6):1414-22.

Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001; **14**(4):933-51.

Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebize R, Diancourt L, Grimont P. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One.* 2009; **4**(3):e4982.

Brizio A, Vasco S, Gonçalves AR, Lito LM, Cristino JM, Salgado MJ, Duarte A. Survey of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates from a Portuguese hospital and characterisation of a novel class 1 integron (In60A) carrying the bla_{CTX-M-9} gene. *Int J Antimicrob Agents.* 2006; **28**(4):320-4.

Burke L, Humphreys H, Fitzgerald-Hughes D. The revolving door between hospital and community: extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Dublin. *J Hosp Infect.* 2012; **81**(3):192-8.

Bush K, Fisher JF. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2011; **65**:455-78.

Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; **39**(6):1211-33.

Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; **54**(3):969-76.

Bush K. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Curr Opin Microbiol.* 2010a; **13**(5):558-64.

Bush K. Bench-to-bedside review: The role of beta-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Crit Care.* 2010b; **14**(3):224.

Bush K. Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Ann N Y Acad Sci.* 2013a; **1277**:84-90.

Bush K. The ABCD's of β -lactamase nomenclature. *J Infect Chemother.* 2013c; **19**(4):549-59.

Bush, K. Carbapenemases: Partners in crime. *J Glob Antimicrob Resist.* 2013b; **1**: 17–16.

Buul LW, van der Steen JT, Veenhuizen RB, Achterberg WP, Schellevis FG, Essink RT, van Benthem BH, Natsch S, Hertogh CM. Antibiotic use and resistance in long term care facilities. *J Am Med Dir Assoc.* 2012;**13**(6):568.e1-13.

Calhau V, Ribeiro G, Mendonça N, Da Silva G. Prevalent combination of virulence and plasmidic-encoded resistance in ST 131 *Escherichia coli* strains. *Virulence.* 2013; 9; **4**(8): 1-9.

Cantey JB, Sreeramoju P, Jaleel M, Treviño S, Gander R, Hynan LS, Hill J, Brown C, Chung W, Siegel JD, Sánchez PJ. Prompt control of an outbreak caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *J Pediatr.* 2013; **163**(3):672-9.e1-3.

Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* 2006; **9**(5):466-75.

Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* 2006; **9**(5):466-75.

Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol.* 2012b 2; **3**:110.

Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2008; Suppl **14**(1):144-53.

Cantón R, Ruiz-Garbajosa P. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Curr Opin Pharmacol.* 2011; **11**(5):477-85.

Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol.* 2013; **303**(6-7):298-304.

Carattoli A. Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *Int J Med Microbiol.* 2011; **301**(8):654-8.

Carattoli A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; **53**(6):2227-38.

Carlet J, Pittet D. Access to antibiotics: a safety and equity challenge for the next decade. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2013 10; **2**(1):1.

Carlet J. The gut is the epicentre of antibiotic resistance. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2012 27; **1**(1):39.

Carneiro R, Chau F, Soars C, Fialho JÁ, Sacadura MJ. O Envelhecimento da População: Dependência, Ativação e Qualidade. Centro de Estudos dos Povos e Culturas de Expressão Portuguesa. Faculdade de Ciências Humanas. Universidade Católica Portuguesa; 2012.

Carrër A, Nordmann P. CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae*: a change in the epidemiology of ESBL. *J Pathol Biol (Paris)*. 2011; **59**(6):e133-5.

Cascio GL, Soldani F, Mazzariol A, Lleo MM. The High Incidence of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Urine from Elderly Hospital Patients May Facilitate the Spread of Resistant Strains to the Community. *Microb Drug Resist*. 2013 **20**.

Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2007;**60**(2):394-7.

CDC, Antibiotic Resistance Threats in the United States. Us Department of Health and Human Services. 2013.

Cecilio P, Gonçalves D, Ferreira H. Carbapenemase producing Enterobacteriaceae in Porto Urban Area Wastewaters. ECCMID, 2013, Berlin

Cecílio P, Gonçalves D, Ferreira H.. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Porto urban area wastewaters. ECCMID, 2013, Berlin

Censos. Instituto Nacional de Estatística de Portugal, 2011.

Cerdeira A. Detecção de *Enterobacteriaceae* produtores de β -lactamases de espectro alargado em isolados clínicos urinários do ambulatório e isolados responsáveis por colonização fecal de idosos na zona noroeste de Portugal. Tese de Mestrado. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2012.

Chandra, S. Extended-Spectrum Beta-Lactamase Infections. *Curr Emerg Hosp Med Rep* 2013, **1**:145-148

Chen PL, Ko WC. A continuous challenge from Gram-negative bacteria: more carbapenemases. *Microbiol Immunol Infect*. 2010; **43**(5):351-3.

Chong Y, Ito Y, Kamimura T. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Infect Genet Evol. 2011; **11**(7):1499-504.

Chouchani C, El Salabi A, Marrakchi R, Abouelkacem N, Walsh TR. Occurrence of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* harboring chromosomally mediated and plasmid-mediated CTX-M-15 β -lactamase in a Tunisian hospital. Can J Microbiol. 2012; **58**(9):1099-103.

Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. Cell. 2012 16;148(6):1258-70.

Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl Environ Microbiol. 2000; **66**(10):4555-8.

Clermont O, Dhanji H, Upton M, Gibreel T, Fox A, Boyd D, Mulvey MR, Nordmann P, Ruppé E, Sarthou JL, Frank T, Vimont S, Arlet G, Branger C, Woodford N, Denamur E. Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. J Antimicrob Chemother. 2009;64(2):274-7.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-third Informational Supplement. Document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.

Colomer-Lluch M, Mora A, López C, Mamani R, Dahbi G, Marzoa J, Herrera A, Viso S, Blanco JE, Blanco M, Alonso MP, Jofre J, Muniesa M, Blanco J. Detection of quinolone-resistant *Escherichia coli* isolates belonging to clonal groups O25b:H4-B2-ST131 and O25b:H4-D-ST69 in raw sewage and river water in Barcelona, Spain. J Antimicrob Chemother. 2013; **68**(4):758-65.

Colpan A, Johnston B, Porter S, Clabots C, Anway R, Thao L, Kuskowski MA, Tchesnokova V, Sokurenko EV, Johnson JR; VICTORY (Veterans Influence of Clonal Types on Resistance: Year 2011) Investigators. *Escherichia coli* Sequence Type 131 (ST131) Subclone H30 as an Emergent Multidrug-Resistant Pathogen Among US Veterans. Clin Infect Dis. 2013; 57(9):1256-65.

Conceição T, Brízio A, Duarte A, Barros R. First isolation of bla(VIM-2) in *Klebsiella oxytoca* clinical isolates from Portugal. Antimicrob Agents Chemother. 2005 Jan; **49**(1):476.

- Coque TM, Baquero F, Canton R.** Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro Surveill.* 2008 Nov 20; **13**(47). pii: 19044.
- Coque TM, Novais A, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, Baquero F, Cantón R, Nordmann P.** Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis.* 2008b;**14**(2):195-200.
- Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM.** Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect Dis.* 2011; **11**(5):381-93.
- Correia S, Pacheco R, Radhouani H, Diniz JC, Ponce P, Jones-Dias D, Caniça M, Igrejas G, Poeta P.** High prevalence of ESBL-producing *Escherichia coli* isolates among hemodialysis patients in Portugal: appearance of ST410 with the bla(CTX-M-14) gene. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012; **74**(4):423-5.
- Cox G, Wright GD.** Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol.* 2013; **303**(6-7):287-92.
- Croxall G, Hale J, Weston V, Manning G, Cheetham P, Achtman M, McNally A.** Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from a regional cohort of elderly patients highlights the prevalence of ST131 strains with increased antimicrobial resistance in both community and hospital care settings. *J Antimicrob Chemother.* 2011; **66**(11):2501-8.
- Curiao T, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P, Robustillo A, Baquero F, Coque TM, Cantón R.** Emergence of bla KPC-3-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2010; **65**(8):1608-14.
- Cuzon G, Bonnin RA, Nordmann P.** First identification of novel NDM carbapenemase, NDM-7, in *Escherichia coli* in France. *PLoS One.* 2013; **8**(4):e61322.
- Da Costa PM, Loureiro L, Matos AJ.** Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: the interface between humans, animals and the environment. *Int J Environ Res Public Health.* 2013 14; **10**(1):278-94.
- Da Silva GJ, Mendonça N.** Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli* . *Virulence.* 2012; **3**(1):18-28.
- Da Silva, G. Duarte, A.** Carbapenemases em bactérias de Gram negativo: o novo desafio terapêutico. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas* 2011, 3(7).

- Dahbi G, Mora A, López C, Alonso MP, Mamani R, Marzoa J, Coira A, García-Garrote F, Pita JM, Velasco D, Herrera A, Viso S, Blanco JE, Blanco M, Blanco J.** Emergence of new variants of ST131 clonal group among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases. *Int J Antimicrob Agents*. 2013; **42**(4):347-51.
- Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G.** Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*. 2010; **65**(3):490-5.
- D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM.** CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol*. 2013 ; **303**(6-7):305-17.
- Davies J, Davies D.** Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010; **74**(3):417-33.
- de Lastours V, Bleibtreu A, Chau F, Burdet C, Duval X, Denamur E, Fantin B.** Quinolone-resistant *Escherichia coli* from the faecal microbiota of healthy volunteers after ciprofloxacin exposure are highly adapted to a commensal lifestyle. *J Antimicrob Chemother*. 2013, **22**: 1-6.
- de Lastours V, Chau F, Tubach F, Pasquet B, Ruppé E, Fantin B.** Independent behavior of commensal flora for carriage of fluoroquinolone-resistant bacteria in patients at admission. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; **54**(12):5193-200.
- DebRoy C, Roberts E, Fratamico PM.** Detection of O antigens in *Escherichia coli*. *Anim Health Res Rev*. 2011; **12**(2):169-85.
- Denisuik AJ, Lagacé-Wiens PR, Pitout JD, Mulvey MR, Simner PJ, Tailor F, Karlowsky JA, Hoban DJ, Adam HJ, Zhanel GG; Canadian Antimicrobial Resistance Alliance.** Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-, AmpC β -lactamase- and carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Canadian hospitals over a 5 year period: CANWARD 2007-11. *J Antimicrob Chemother*, 2013; **68** Suppl 1:i57-65.
- Denton M.** *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents*. 2007; **29** Suppl 3:S9-S22.
- Dhanji H, Doumith M, Clermont O, Denamur E, Hope R, Livermore DM, Woodford N.** Real-time PCR for detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* and its CTX-M-15-like extended-spectrum beta-lactamases. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; **36**(4):355-8.

Dhanji H, Woodford N, Hope R. Diversity of *Escherichia coli* with CTX-M ESBLs in long-term care facilities (LTCFs) in Belfast. Abstracts of the Forty-eighth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 2008; Washington, DC. Washington, DC, USA: American Society for Microbiology; p. 202. Abstract C2-3890.

Dhillon RH, Clark J. ESBLs: A Clear and Present Danger? Crit Care Res Pract. 2012;**2012**:625170.

Diário da República, 1.^a série - N.º 58 de 21 de março de 2012. Lares de Idosos.

Direcção-Geral de Saúde. Plano Operacional de Controlo de Infecção para as unidades de Cuidados Continuados Integrados. Circular Normativa N°17/DSQC/DSC, de 20/09/07.

Doi Y, Park YS, Rivera JI, Adams-Haduch JM, Hingwe A, Sordillo EM, Lewis JS 2nd, Howard WJ, Johnson LE, Polsky B, Jorgensen JH, Richter SS, Shutt KA, Paterson DL. Community-associated extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* infection in the United States. Clin Infect Dis. 2013; **56**(5):641-8.

Domingo, A A (2013). Patogenia de las Infecciones del Trato Urinario. In Infección del Tracto Urinario. Editor Carlos Pigrau, SALVAT. Barcelona

Donskey CJ. Antibiotic regimens and intestinal colonization with antibiotic-resistant gram-negative bacilli. Clin Infect Dis. 2006 1;**43** Suppl 2:S62-9.

Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. Clin Microbiol Rev. 2010; **23**(1):160-201.

Dryden M, Johnson AP, Ashiru-Oredope D, Sharland M. Using antibiotics responsibly: right drug, right time, right dose, right duration. J Antimicrob Chemother. 2011; **66**(11):2441-3.

Duljasz W, Gniadkowski M, Sitter S, Wojna A, Jebelean C. First organisms with acquired metallo-beta-lactamases (IMP-13, IMP-22, and VIM-2) reported in Austria. Antimicrob Agents Chemother. 2009; **53**(5):2221-2.

El Salabi A, Walsh TR, Chouchani C. Extended spectrum β -lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. Crit Rev Microbiol. 2013; **39**(2):113-22.

Endimiani A, Bonomo RA. ESBLs: an emerging problem in pediatric infectious diseases. Journal of Pediatric Infectious Diseases 2008; **3**:217-220

Enne VI. Reducing antimicrobial resistance in the community by restricting prescribing: can it be done? *J Antimicrob Chemother.* 2010 ;**65**(2):179-82.

Espinar MJ, Rocha R, Ribeiro M, Gonçalves Rodrigues A, Pina-Vaz C. Extended-spectrum β -lactamases of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* screened by the VITEK 2 system. *J Med Microbiol.* 2011; **60**(Pt 6):756-60.

Esposito S, Leone S, Noviello S, Lanniello F, Fiore M. Antibiotic resistance in long-term care facilities. *New Microbiol.* 2007 ;**30**(3):326-31.

EUCAST. 2013. EUCAST Clinical Breakpoint. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, disponível em <http://www.eucast.org/>

Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. *J Hosp Infect.* 2009;**73**(4):345-54.

Farinha T. Prevalência e resistência aos antibióticos de isolados de infecções do trato urinário na zona de Castelo Branco. Tese de Mestrado. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 2012

Feldman N, Adler A, Molshatzki N, Navon-Venezia S, Khabra E, Cohen D, Carmeli Y. Gastrointestinal colonization by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* following hospital discharge: duration of carriage and risk factors for persistent carriage. *Clin Microbiol Infect.* 2013; **19**(4):E190-6.

Ferjani S, Saidani M, Ennigrou S, Hsairi M, Slim AF, Boutiba Ben Boubaker I. Multidrug resistance and high virulence genotype in uropathogenic *Escherichia coli* due to diffusion of ST131 clonal group producing CTX-M-15: an emerging problem in a Tunisian hospital. *Folia Microbiol (Praha).* 2013, **21**.

Fernández L, Breidenstein EB, Hancock RE. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resist Updat.* 2011;**14**(1):1-21.

Ferreira C. Beta-Lactamases de Espectro Ampliado em Isolados Urinários de *Enterobacteriaceae* do Ambulatório. Tese de Mestrado em Análises Clínicas. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 2008.

Finley RL, Collignon P, Larsson DG, McEwen SA, Li XZ, Gaze WH, Reid-Smith R, Timinouni M, Graham DW, Topp E. The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clin Infect Dis.* 2013; **57**(5):704-10.

Flint HJ, O'Toole PW, Walker AW. Special issue: The Human Intestinal Microbiota. Microbiology. 2010; **156**(Pt 11):3203-4.

Furuya EY, Lowy FD. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. Nat Rev Microbiol. 2006; **4**(1):36-45.

García-Hernández AM, García-Vázquez E, Hernández-Torres A, Ruiz J, Yagüe G, Herrero JA, Gómez J. Bacteraemia due to *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL): clinical relevance and today's insights. Rev Esp Quimioter. 2011; **24**(2):57-66.

Garmendia L, Hernandez A, Sanchez MB, Martinez JL. Metagenomics and antibiotics. Clin Microbiol Infect. 2012; **18** Suppl 4:27-31.

Gazin M, Paasch F, Goossens H, Malhotra-Kumar S; MOSAR WP2 and SATURN WP1 Study Teams. Current trends in culture-based and molecular detection of extended-spectrum- β -lactamase-harboring and carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol. 2012; **50**(4):1140-6.

Geffen Y, Adler A, Paikin S, Khabra E, Gorenshtein S, Aronov R, Carmeli Y. Detection of the plasmid-mediated KPC-2 carbapenem-hydrolysing enzyme in three unusual species of the *Enterobacteriaceae* family in Israel. J Antimicrob Chemother. 2013; **68**(3):719-20.

GenBank - National Center for Biotechnology Information, NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Giani T, D'Andrea MM, Pecile P, Borgianni L, Nicoletti P, Tonelli F, Bartoloni A, Rossolini GM. Emergence in Italy of *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 producing KPC-3 Carbapenemase. J Clin Microbiol. 2009;**47**(11):3793-4.

Gibreel TM, Dodgson AR, Cheesbrough J, Bolton FJ, Fox AJ, Upton M. High metabolic potential may contribute to the success of ST131 uropathogenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2012;**50**(10):3202-7.

Gijón, D., Curiao, T., Baquero, F., Coque, T. M. and Cantón, R. (2012). Fecal Carriage of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*: a Hidden Reservoir in Hospitalized and Nonhospitalized Patients. J. Clin. Microbiol. 2012, **50**(5): 1558-1563

- Giske CG, Monnet DL, Cars O, Carmeli Y; ReAct-Action on Antibiotic Resistance.** Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Mar;**52**(3):813-21.
- Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, Woodford N, Nordmann P, Paterson DL, Cantón R, Walsh TR.** Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother.* 2009;**63**(1):1-4.
- Glasner C, Albiger B, Buist G, Tambić Andrasević A, Canton R, Carmeli Y, Friedrich AW, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Nordmann P, Poirel L, Rossolini GM, Seifert H, Vatopoulos A, Walsh T, Woodford N, Donker T, Monnet DL, Grundmann H; European Survey on Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE) Working Group.** Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. *Euro Surveill.* 2013;**18**(28). pii: 20525.
- Gniadkowski M.** Evolution and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clin Microbiol Infect.* 2001;**7**(11):597-608.
- Gonçalves D, Ferreira H.** Extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* in the faecal flora of Portuguese nursing home residents. *Clin Microb Infect* 2009 **15**, S4, 479
- Gonçalves D, Ferreira H.** MDR *Acinetobacter baumannii* faecal colonization of nursing home residents of northern Portugal. *Clin Microbiol Infect* 2011, **17**, S2, 53
- Gonçalves D, Rodrigues H, Ferreira H.** Paediatric faecal colonization with extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* in Northern Portugal, *Clin Microbiol Infect* 2010, **16**, S2, 354
- Gonçalves, D.** Beta-lactamases de espectro Alargado em Enterobacteriaceae da flora fecal de idosos. Tese de Mestrado em Microbiologia. Aveiro: Universidade de Aveiro; 2008.
- Gootz TD, Lescoe MK, Dib-Hajj F, Dougherty BA, He W, Della-Latta P, Huard RC.** Genetic organization of transposase regions surrounding *bla*_{KPC} carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;**53**(5):1998-2004.

Gould IM. Antibiotic resistance: the perfect storm. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;**34** Suppl 3:S2-5.

Gould IM. Antibiotic resistance: understanding how to control it. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;**40**(3):193-5.

Gruber I, Heudorf U, Werner G, Pfeifer Y, Imirzalioglu C, Ackermann H, Brandt C, Besier S, Wichelhaus TA. Multidrug-resistant bacteria in geriatric clinics, nursing homes, and ambulant care - Prevalence and risk factors. *Int J Med Microbiol*. 2013;**303**(8):405-9.

Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, Canton R, Rossolini GM, Campos J, Vatopoulos A, Gniadkowski M, Toth A, Pfeifer Y, Jarlier V, Carmeli Y; CNSE Working Group. Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill*. 2010 18;**15**(46). pii: 19711.

Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2003 8;**361**(9356):512-9.

Guimarães B, Barreto A, Radhouani H, Figueiredo N, Gaspar E, Rodrigues J, Torres C, Igrejas G, Poeta P. Genetic detection of extended-spectrum beta-lactamase-containing *Escherichia coli* isolates and vancomycin-resistant enterococci in fecal samples of healthy children. *Microb Drug Resist*. 2009;**15**(3):211-6.

Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis*. 2011 1;**53**(1):60-7.

Han JH, Maslow J, Han X, Xie SX, Tolomeo P, Santana E, Carson L, Lautenbach E. Risk Factors for the Development of Gastrointestinal Colonization With Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* in Residents of Long-Term Care Facilities. *J Infect Dis*. 2013b 17: 1-6

Han JH, Nachamkin I, Tolomeo P, Mao X, Bilker WB, Lautenbach E. Temporal changes in resistance mechanisms in colonizing *Escherichia coli* isolates with reduced susceptibility to fluoroquinolones. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013a;**76**(4):491-6.

Haraoui LP, Lévesque S, Lefebvre B, Blanchette R, Tomkinson M, Mataseje L, Mulvey MR, Miller MA. Polyclonal outbreak of KPC-3-producing *Enterobacter cloacae* at a single hospital in Montreal, Quebec, Canada. *J Clin Microbiol*. 2013;**51**(7):2406-8.

Helfand MS, Bonomo RA. Current challenges in antimicrobial chemotherapy: the impact of extended-spectrum beta-lactamases and metallo-beta-lactamases on the treatment of resistant Gram-negative pathogens. *Curr Opin Pharmacol.* 2005;**5**(5):452-8.

Helldal L, Karami N, Florén K, Welinder-Olsson C, Moore ER, Åhrén C. Shift of CTX-M genotypes has determined the increased prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in south-western Sweden. *Clin Microbiol Infect.* 2013;**19**(2):E87-90.

Heudorf U, Boehlcke K, Schade M. Healthcare-associated infections in long-term care facilities (HALT) in Frankfurt am Main, Germany, January to March 2011. *Euro Surveill.* 2012 30;**17**(35). pii: 20256.

Hilty M, Betsch BY, Bögli-Stuber K, Heiniger N, Stadler M, Küffer M, Kronenberg A, Rohrer C, Aebi S, Endimiani A, Droz S, Mühlemann K. Transmission dynamics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in the tertiary care hospital and the household setting. *Clin Infect Dis.* 2012;**55**(7):967-75.

Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother.* 2010;**65**(6):1119-25.

Hoban DJ, Lascols C, Nicolle LE, Badal R, Bouchillon S, Hackel M, Hawser S. Antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae*, including molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing species, in urinary tract isolates from hospitalized patients in North America and Europe: results from the SMART study 2009-2010. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;**74**(1):62-7.

Hunter PA, Dawson S, French GL, Goossens H, Hawkey PM, Kuijper EJ, Nathwani D, Taylor DJ, Teale CJ, Warren RE, Wilcox MH, Woodford N, Wulf MW, Piddock LJ. Antimicrobial-resistant pathogens in animals and man: prescribing, practices and policies. *J Antimicrob Chemother.* 2010;**65** Suppl 1:i3-17.

Jana S, Deb JK. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;**70**(2):140-50.

Jans B, Schoevaerdts D, Huang TD, Berhin C, Latour K, Bogaerts P, Nonhoff C, Denis O, Catry B, Glupczynski Y. Epidemiology of multidrug-resistant microorganisms among nursing home residents in Belgium. *PLoS One.* 2013; 30;**8**(5):e64908.

Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology*. 2010;**156**(Pt 11):3216-23.

Johnson AP, Woodford N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *J Med Microbiol*. 2013; **62**(Pt 4):499-513.

Johnson JR, Nicolas-Chanoine MH, DebRoy C, Castanheira M, Robicsek A, Hansen G, Weissman S, Urban C, Platell J, Trott D, Zhanel G, Clabots C, Johnston BD, Kuskowski MA; MASTER Investigators. Comparison of *Escherichia coli* ST131 pulsotypes, by epidemiologic traits, 1967-2009. *Emerg Infect Dis*. 2012;**18**(4):598-607.

Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis*. 2000; **181**(1):261-72.

Kassis-Chikhani N, Vimont S, Asselat K, Trivalle C, Minassian B, Sengelin C, Gautier V, Mathieu D, Dussaix E, Arlet G. CTX-M beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in long-term care facilities, France. *Emerg Infect Dis*. 2004;**10**(9):1697-8.

Keynan Y, Rubinstein E. The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;**30**(5):385-9. Epub 2007 Aug 22.

Köhler CD, Dobrindt U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *Int J Med Microbiol*. 2011 ;**301**(8):642-7.

Kong KF, Schneper L, Mathee K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS*. 2010; **118**(1):1-36.

Kudinha T, Johnson JR, Andrew SD, Kong F, Anderson P, Gilbert GL. *Escherichia coli* sequence type 131 as a prominent cause of antibiotic resistance among urinary *Escherichia coli* isolates from reproductive-age women. *J Clin Microbiol*. 2013;**51**(10):3270-6.

Ladirat SE, Schols HA, Nauta A, Schoterman MH, Keijser BJ, Montijn RC, Gruppen H, Schuren FH. High-throughput analysis of the impact of antibiotics on the human intestinal microbiota composition. *J Microbiol Methods*. 2013;**92**(3):387-97.

Lahey Clinic: disponível em <http://www.lahey.org/Studies/>

- Landelle C, Pagani L, Harbarth S.** Is patient isolation the single most important measure to prevent the spread of multidrug-resistant pathogens? *Virulence*. 2013 **15**;4(2):163-71.
- Lautenbach E, Han J, Santana E, Tolomeo P, Bilker WB, Maslow J.** Colonization with extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species in long-term care facility residents. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2012;**33**(3):302-4.
- Lautenbach E.** Editorial commentary: flying under the radar: the stealth pandemic of *Escherichia coli* sequence type 131. *Clin Infect Dis*. 2013;**57**(9):1266-9.
- Lawley TD, Walker AW.** Intestinal colonization resistance. *Immunology*. 2013;**138**(1):1-11.
- Leavitt A, Chmelnitsky I, Colodner R, Ofek I, Carmeli Y, Navon-Venezia S.** Ertapenem resistance among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol*. 2009;**47**(4):969-74.
- Leavitt A, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Schwaber MJ, Carmeli Y.** Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;**51**(8):3026-9.
- Lee JH, Bae IK, Lee SH.** New definitions of extended-spectrum β -lactamase conferring worldwide emerging antibiotic resistance. *Med Res Rev*. 2012;**32**(1):216-32.
- Leflon-Guibout V, Jurand C, Bonacorsi S, Espinasse F, Guelfi MC, Duportail F, Heym B, Bingen E, Nicolas-Chanoine MH.** Emergence and spread of three clonally related virulent isolates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* with variable resistance to aminoglycosides and tetracycline in a French geriatric hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;**48**(10):3736-42.
- Leung V, Loo VG, Frenette C, Domingo MC, Bourgault AM, Mulvey MR, Robson HG.** First Canadian outbreak of *Enterobacteriaceae*-expressing *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase type 3. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2012 Fall;**23**(3):117-20.
- Levy Hara G, Gould I, Endimiani A, Pardo PR, Daikos G, Hsueh PR, Mehtar S, Petrikkos G, Casellas JM, Daciuk L, Paciel D, Novelli A, Saginur R, Pryluka D, Medina J, Savio E.** Detection, treatment, and prevention of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: recommendations from an International Working Group. *J Chemother*. 2013;**25**(3):129-40.

Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med.* 2004;**10**(12 Suppl):S122-9.

Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;**12**(5):371-87.

Liss MA, Peterson EM, Johnston B, Osann K, Johnson JR. Prevalence of ST131 among fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* obtained from rectal swabs before transrectal prostate biopsy. *Urology.* 2013;**81**(3):548-55.

Livermore DM, Andrews JM, Hawkey PM, Ho PL, Keness Y, Doi Y, Paterson D, Woodford. Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? *J Antimicrob Chemother.* 2012a; **67**(7):1569-77.

Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Doumith M, Zhang J, Woodford N. What remains against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;**37**(5):415-9.

Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol.* 2000;**3**(5):489-95.

Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med.* 2012;**27**(2):128-42.

Livermore DM. Fourteen years in resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2012b;**39**(4):283-94.

Livermore DM. Has the era of untreatable infections arrived? *J Antimicrob Chemother.* 2009;**64** Suppl 1:i29-36.

Llarrull LI, Testero SA, Fisher JF, Mobashery S. The future of the β -lactams. *Curr Opin Microbiol.* 2010;**13**(5):551-7.

Löhr IH, Rettedal S, Natås OB, Naseer U, Oymar K, Sundsfjord A. Long-term faecal carriage in infants and intra-household transmission of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* following a nosocomial outbreak. *J Antimicrob Chemother.* 2013; **68**(5):1043-8.

López-Cerero L, Bellido Mdel M, Serrano L, Liró J, Cisneros JM, Rodríguez-Baño J, Pascual A. *Escherichia coli* O25b:H4/ST131 are prevalent in Spain and are often not

associated with ESBL or quinolone resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013a; **31**(6):385-8.

López-Cerero L, Navarro MD, Bellido M, Martín-Peña A, Viñas L, Cisneros JM, Gómez-Langley SL, Sánchez-Monteseirín H, Morales I, Pascual A, Rodríguez-Baño J. *Escherichia coli* belonging to the worldwide emerging epidemic clonal group O25b/ST131: risk factors and clinical implications. *J Antimicrob Chemother*. 2013b **11**.

Ludden C, Cormican M, Austin B, Morris D. Rapid environmental contamination of a new nursing home with antimicrobial-resistant organisms preceding occupation by residents. *J Hosp Infect*. 2013; **83**(4):327-9.

Lupo A, Papp-Wallace KM, Sendi P, Bonomo RA, Endimiani A. Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;**77**(3):179-94.

Luvsansharav UO, Hirai I, Niki M, Nakata A, Yoshinaga A, Yamamoto A, Yamamoto M, Toyoshima H, Kawakami F, Matsuura N, Yamamoto Y. Fecal carriage of CTX-M β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in nursing homes in the Kinki region of Japan. *Infect Drug Resist*. 2013;**6**:67-70.

Machado E, Amaral S, Ferreira R, Silva R, Novais Â, Faria C, Grañeda J L, Cantón R, Coque T, Peixe, L. (2009c). Emergence of CTX-M-28-producing *Enterobacteriaceae* in Portugal, 3rd FEMS Congress of European Microbiologists, Gothenburg, 2009.

Machado E, Coque TM, Cantón R, Baquero F, Sousa JC, Peixe L; Portuguese Resistance Study Group. Dissemination in Portugal of CTX-M-15-, OXA-1-, and TEM-1-producing *Enterobacteriaceae* strains containing the *aac(6')-Ib-cr* gene, which encodes an aminoglycoside- and fluoroquinolone-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;**50**(9):3220-1.

Machado E, Coque TM, Cantón R, Sousa JC, Peixe L. Commensal *Enterobacteriaceae* as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamases, integrons, and *sul* genes in Portugal. *Front Microbiol*. 2013 **8**;4:80.

Machado P, Silva A, Lito L, Melo-Cristino J, Duarte A. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST11-producing KPC-3 carbapenemase at a Lisbon hospital. *Clin Microbiol Infect* 2010; **16**, Supl 2: S28.

- Machado, E, Rocha, J, Coque, T, Cantón, R, Sousa, J, Ferreira, H, Peixe, L..** Aquatic environment contamination with na epidemic *Escherichia coli* clone harbouring *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{TEM-1} and *aac*(6')-Ib-cr in Portugal. Clin Microbiol Infect 2008, **14**, S7, 439
- MacPherson DW, Gushulak BD, Baine WB, Bala S, Gubbins PO, Holtom P, Segarra-Newnham M.** Population mobility, globalization, and antimicrobial drug resistance. Emerg Infect Dis. 2009;**15**(11):1727-32.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL.** Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012;**18**(3):268-81.
- Magiorakos AP, Suetens C, Monnet DL, Gagliotti C, Heuer OE; EARS-Net Coordination Group and EARS-Net participants.** The rise of carbapenem resistance in Europe: just the tip of the iceberg? Antimicrob Resist Infect Control. 2013 **14**;**2**(1):6.
- Mainil J.** *Escherichia coli* virulence factors. Vet Immunol Immunopathol. 2013 **15**;**152**(1-2):2-12.
- Mamina C.** The global crisis of multidrug resistance: how to face healthcare associated infections without effective antibiotics? Iran J Microbiol. 2013;**5**(2):99-101.
- Manageiro V, Ferreira E, Jones-Dias D, Louro D, Pinto M, Diogo J, Caniça M.** Emergence and risk factors of β -lactamase-mediated resistance to oxyimino- β -lactams in *Enterobacteriaceae* isolates. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012a;**72**(3):272-7.
- Manageiro, V., Ferreira, E., Louro, D., Caniça, M. and behalf of the Antimicrobial Resistance Surveillance Program in Portugal (ARSIP).** Polyclonal KPC-3-producing *Enterobacteriaceae* in Portugal. II International Conference on Antimicrobial Research - ICAR2012. Lisbon (Portugal) 21-23 November 2012b.
- March A, Aschbacher R, Dhanji H, Livermore DM, Böttcher A, Sleghele F, Maggi S, Noale M, Larcher C, Woodford N.** Colonization of residents and staff of a long-term-care facility and adjacent acute-care hospital geriatric unit by multiresistant bacteria. Clin Microbiol Infect. 2010;**16**(7):934-44.

- Marchaim D, Katz D E, Munoz-Price L S.** (2013). Emergence and Control of Antibiotic-resistant Gram-negative Bacilli in Older Adults. *Current Translational Geriatrics and Experimental Gerontology Reports*, **2**(3):113-124
- Marshall, B M, Ochieng, D J, Levy S B.** Commensals: Underappreciated Reservoir of Antibiotic Resistance. *Microbe* 2009, **4**(5): 231-238
- Marwick C, Santiago VH, McCowan C, Broomhall J, Davey P.** Community acquired infections in older patients admitted to hospital from care homes versus the community: cohort study of microbiology and outcomes. *BMC Geriatr.* 2013 **6**;13:12.
- Maslow JN, Lautenbach E, Glaze T, Bilker W, Johnson JR.** Colonization with extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* among nursing home residents and its relationship to fluoroquinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;**48**(9):3618-20.
- Maslow JN, Lee B, Lautenbach E.** Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* carriage in long-term care facility. *Emerg Infect Dis.* 2005 J;**11**(6):889-94.
- McClellan P, Hughes C, Tunney M, Goossens H, Jans B; European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC) Nursing Home Project Group.** Antimicrobial prescribing in European nursing homes. *J Antimicrob Chemother.* 2011;**66**(7):1609-16.
- Mendelson G, Hait V, Ben-Israel J, Gronich D, Granot E, Raz R.** Prevalence and risk factors of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in an Israeli long-term care facility. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005 ;**24**(1):17-22.
- Mendonça N, Ferreira E, Louro D; ARSIP Participants, Caniça M.** Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of extended- and broad-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Portugal. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;**34**(1):29-37.
- Mendonça N, Leitão J, Manageiro V, Ferreira E, Caniça M.** Spread of extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;**51**(6):1946-55.

Mendonça N, Louro D, Castro AP, Diogo J, Caniça M. CTX-M-15, OXA-30 and TEM-1-producing *Escherichia coli* in two Portuguese regions. *J Antimicrob Chemother.* 2006a;**57**(5):1014-6.

Menezes GA, Khan MA, Hays JP. Important methodological considerations with respect to differentiation of CTX-M-15 and CTX-M-28 extended-spectrum beta-lactamases. *Indian J Med Microbiol.* 2010;**28**(1):81-2.

Mills J, Chapin K, Andrea S, Furtado G, Mermel L. Community and nursing home residents with carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2011;**32**(6):629-31.

Ministério da Saúde e da Solidariedade Social. Guia da Rede Nacional de Cuidados Continuados Integrados (RNCCI). Unidade de Missão para os Cuidados Continuados Integrados, 2009.

Ministério da Saúde. Norma da Direção-Geral da Saúde nº004/2013 de 21 de Fevereiro. Vigilância Epidemiológica das Resistências aos Antimicrobianos. Departamento da Qualidade na Saúde.

Ministério da Saúde. Orientação da Direção-Geral da Saúde nº006/2010 de 04 de Outubro de 2010. *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases New Delhi metalo- β -lactamase 1 (NDM-1). Departamento de Qualidade da Saúde, 1-2.

Ministérios do Trabalho e da Solidariedade Social e da Saúde. Despacho n.º 3730/2011, Diário da República n.º 40, Série II de 25 de Fevereiro de 2011. Identificação das unidades que integram a Rede Nacional de Cuidados Continuados Integrados (RNCCI) 2010 e 2011.

Mirelis B, Navarro F, Miró E, Mesa RJ, Coll P, Prats G. Community transmission of extended-spectrum beta-lactamase. *Emerg Infect Dis.* 2003;**9**(8):1024-5.

Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M, Malamou-Lada E, Martinez-Martinez L, Navarro F, Nordmann P, Peixe L, Pournaras S, Rossolini GM, Tsakris A, Vatopoulos A, Cantón R. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect.* 2010;**16**(2):112-22.

Miró, E., Agüero, J., Larrosa, M. N., Fernández, A., Conejo, M. C., Bou, G., González-López, J. J., Lara, N., Martínez-Martínez, L., Oliver, A., Aracil, B., Oteo, J., Pascual,

A., Rodríguez-Baño, J., Zamorano, L. and Navarro, F. (2013). Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC β -lactamases and carbapenemases in *Enterobacteriaceae* isolates from 35 hospitals in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; **32**:253–259

Mody L. Infection control issues in older adults. *Clin Geriatr Med*. 2007;**23**(3):499-514, vi.

Moriel DG, Rosini R, Seib KL, Serino L, Pizza M, Rappuoli R. *Escherichia coli* : great diversity around a common core. *MBio*. 2012 5;**3**(3).

Morris D, Boyle F, Ludden C, Condon I, Hale J, O'Connell N, Power L, Boo TW, Dhanji H, Lavallee C, Woodford N, Cormican M. Production of KPC-2 carbapenemase by an *Escherichia coli* clinical isolate belonging to the international ST131 clone. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 ;**55**(10):4935-6.

Morris D, McGarry E, Cotter M, Passet V, Lynch M, Ludden C, Hannan MM, Brisse S, Cormican M. Detection of OXA-48 carbapenemase in the pandemic clone *Escherichia coli* O25b:H4-ST131 in the course of investigation of an outbreak of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;**56**(7):4030-1.

Mulvey MR, Simor AE. Antimicrobial resistance in hospitals: how concerned should we be? *CMAJ*. 2009 17;**180**(4):408-15.

Naas T, Cuzon G, Gaillot O, Courcol R, Nordmann P. When carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase Kpc meets *Escherichia coli* ST131 in France. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;**55**(10):4933-4.

Narciso A, Nunes F, Amores T, Lito L, Melo-Cristino J, Duarte A. Persistence of uropathogenic *Escherichia coli* strains in the host for long periods of time: relationship between phylogenetic groups and virulence factors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;**31**(6):1211-7.

Narciso, A., Lito, L., Melo Cristino, J., Duarte, A. *Escherichia coli* Uropatogénica: Resistência aos Antibióticos Versus Factores de Virulência. *Acta Urol* Jul 2010; 27; 2: 11-20

Nguyen HM, Shier KL, Graber CJ. Determining a clinical framework for use of cefepime and β -lactam/ β -lactamase inhibitors in the treatment of infections caused by extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*. 2013, **20**.

Nicolas-Chanoine MH, Jarlier V; 'La Collégiale de Bactériologie-Virologie-Hygiène Hospitalière de l'Assistance Publique, Hôpitaux de Paris, France. Extended-spectrum beta-lactamases in long-term-care facilities. Clin Microbiol Infect. 2008;**14** Suppl 1:111-6.

Nicolas-Chanoine MH, Robert J, Vigan M, Laouénan C, Brisse S, Mentré F, Jarlier V; Coli β study group. Different factors associated with CTX-M-producing ST131 and non-ST131 *Escherichia coli* clinical isolates. PLoS One. 2013 4;**8**(9):e72191.

Nielubowicz GR, Mobley HL. Host-pathogen interactions in urinary tract infection. Nat Rev Urol. 2010; **7**(8):430-41.

Niki M, Hirai I, Yoshinaga A, Ulzii-Orshikh L, Nakata A, Yamamoto A, Yamamoto M, Yamamoto Y. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains in the feces of carriers contribute substantially to urinary tract infections in these patients. Infection. 2011; **39**(5):467-71.

Nordmann P, Cornaglia G. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a call for action! Clin Microbiol Infect. 2012a; **18**(5):411-2.

Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! Trends Mol Med. 2012c; **18**(5):263-72.

Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Rapid detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol. 2012b;**50**(9):3016-22.

Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V; European Network on Carbapenemases. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Clin Microbiol Infect. 2012c;**18**(5):432-8.

Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis. 2011b;**17**(10):1791-8.

Nordmann P, Poirel L, Toleman MA, Walsh TR. Does broad-spectrum beta-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? J Antimicrob Chemother. 2011a;**66**(4):689-92.

Nordmann P, Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother. 2013;**68**(3):487-9.

Novais A, Comas I, Baquero F, Cantón R, Coque TM, Moya A, González-Candelas F, Galán JC. Evolutionary trajectories of beta-lactamase CTX-M-1 cluster enzymes: predicting antibiotic resistance. *PLoS Pathog.* 2010;22;6(1):e1000735.

Novais A, Comas I, Baquero F, Cantón R, Coque TM, Moya, A., González-Candelas, F., Galán, J.C. (2010) Evolutionary Trajectories of Beta-Lactamase CTX-M-1 Cluster Enzymes: Predicting Antibiotic Resistance. *PLoS Pathog* 6(1): e1000735.

Novais A, Pires J, Ferreira H, Costa L, Montenegro C, Vuotto C, Donelli G, Coque TM, Peixe L. Characterization of globally spread *Escherichia coli* ST131 isolates (1991 to 2010). *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 ;56(7):3973-6.

Novais A, Rodrigues C, Branquinho R, Antunes P, Grosso F, Boaventura L, Ribeiro G, Peixe L. Spread of an OmpK36-modified ST15 *Klebsiella pneumoniae* variant during an outbreak involving multiple carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* species and clones. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012a ;31(11):3057-63.

Nurul Atifah MA, Loo HK, Subramaniam G, Wong EH, Selvi P, Ho SE, Kamarulzaman A, Parasakthi N. Faecal prevalence of extended-spectrum Beta-lactamase (ESBL)-producing coliforms in a geriatric population and among haematology patients. *Malays J Pathol.* 2005 ;27(2):75-81.

O'Fallon E, Pop-Vicas A, D'Agata E. The emerging threat of multidrug-resistant gram-negative organisms in long-term care facilities. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2009 ;64(1):138-41.

Olesen B, Hansen DS, Nilsson F, Frimodt-Møller J, Leihof RF, Struve C, Scheutz F, Johnston B, Krogfelt KA, Johnson JR. Prevalence and characteristics of the epidemic multiresistant *Escherichia coli* ST131 clonal group among extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* isolates in Copenhagen, Denmark. *J Clin Microbiol.* 2013;51(6):1779-85.

Olofsson M, Toepfer M, Ostgren CJ, Midlöv P, Matussek A, Lindgren PE, Mölstad S. Low level of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* among Swedish nursing home residents. *Scand J Infect Dis.* 2013;45(2):117-23.

Östholm Balkhed Å, Tärnberg M, Monstein HJ, Hällgren A, Hanberger H, Nilsson LE. High frequency of co-resistance in CTX-M-producing *Escherichia coli* to non-beta-lactam antibiotics, with the exceptions of amikacin, nitrofurantoin, colistin, tigecycline, and fosfomycin, in a county of Sweden. *Scand J Infect Dis.* 2013 ;45(4):271-8.

Oteo J, Cuevas O, López-Rodríguez I, Banderas-Florido A, Vindel A, Pérez-Vázquez M, Bautista V, Arroyo M, García-Caballero J, Marín-Casanova P, González-Sanz R, Fuentes-Gómez V, Oña-Compán S, García-Cobos S, Campos J. Emergence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of multilocus sequence types 1, 11, 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults. *J Antimicrob Chemother.* 2009;**64**(3):524-8.

Oteo, J., Navarro, C., Cercenado, E., Delgado-Iribarren, A., Wilhelmi, I., Orden, B., García, C., Miguelañez, S., Pérez-Vázquez, M., García-Cobos, S., Aracil, B., Bautista, V. and Campos, J.. Spread of *Escherichia coli* Strains with High-Level Cefotaxime and Ceftazidime Resistance between the Community, Long-Term Care Facilities, and Hospital Institutions. *Journal of Clinical Microbiology* 2006, **44**(7), 2359–2366.

Paphitou NI. Antimicrobial resistance: action to combat the rising microbial challenges. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;**42** Suppl:S25-8.

Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;**55**(11):4943-60.

Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005;**18**(4):657-86.

Pedrosa, A S, Duarte, BP, Sousa, MI, Ferreira, HN. Emerging ESBL producers in particular niches of community, 4th Congress of the European Society for Emerging Infections 2007, 30th September to 3rd October: Lisbon, Portugal.

Peirano G, Pitout JD. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;**35**(4):316-21.

Peirano G, Schreckenberger PC, Pitout JD. Characteristics of NDM-1-producing *Escherichia coli* isolates that belong to the successful and virulent clone ST131. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; **55**(6):2986-8.

Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N Engl J Med.* 2010; **362**(19):1804-13.

Pellegrini C, Mercuri PS, Celenza G, Galleni M, Segatore B, Sacchetti E, Volpe R, Amicosante G, Perilli M. Identification of bla(IMP-22) in *Pseudomonas* spp. in urban wastewater and nosocomial environments: biochemical characterization of a new IMP

metallo-enzyme variant and its genetic location. J Antimicrob Chemother. 2009;**63**(5):901-8.

Pelly H, Morris D, O'Connell E, Hanahoe B, Chambers C, Biernacka K, Gray S, Cormican M. Outbreak of extended spectrum beta-lactamase producing *E. coli* in a nursing home in Ireland, May 2006. Euro Surveill. 2006 31;11(8):E060831.1.

Perilli M, Bottoni C, Grimaldi A, Segatore B, Celenza G, Mariani M, Bellio P, Frascaria P, Amicosante G. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* harbouring *bla*_{KPC-3} and *bla*_{VIM-2} from central Italy. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013;**75**(2):218-21.

Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. Int J Med Microbiol. 2010;**300**(6):371-9.

Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. J Clin Microbiol. 2013;**51**(12):4281-3.

Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. Lancet Infect Dis. 2008;**8**(3):159-66.

Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. J Antimicrob Chemother. 2005;**56**(1):52-9.

Pitout JD. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. Front Microbiol. 2012 **19**;3:9.

Pitout JD. Multiresistant Enterobacteriaceae: new threat of an old problem. Expert Rev Anti Infect Ther. 2008;**6**(5):657-69.

Pitout JD. Recent changes in the epidemiology and management of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. F1000 Med Rep. 2009 **16**;1. pii: 84.

Platell JL, Johnson JR, Cobbold RN, Trott DJ. Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* of sequence type ST131 in animals and foods. Vet Microbiol. 2011, 21;**153**(1-2):99-108.

- Poirel L, Barbosa-Vasconcelos A, Simões RR, Da Costa PM, Liu W, Nordmann P.** Environmental KPC-producing *Escherichia coli* isolates in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012a;**56**(3):1662-3.
- Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P.** Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative rods. *Infect Genet Evol.* 2012b;**12**(5):883-93.
- Poirel L, Castanheira M, Carrër A, Rodriguez CP, Jones RN, Smayevsky J, Nordmann P.** OXA-163, an OXA-48-related class D β -lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011a;**55**(6):2546-51.
- Poirel L, Naas T, Nordmann P.** Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;**54**(1):24-38.
- Poirel L, Potron A, Nordmann P.** OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother.* 2012c;**67**(7):1597-606.
- Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P.** Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;**70**(1):119-23.
- Pomba C, López-Cerero L, Bellido M, Serrano L, Belas A, Couto N, Cavaco-Silva P, Rodríguez-Baño J, Pascual A.** Within-lineage variability of ST131 *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in the south of Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2013, **10**, 1-3
- Poulou A, Voulgari E, Vrioni G, Koumaki V, Xidopoulos G, Chatzipantazi V, Markou F, Tsakris A.** Outbreak caused by an ertapenem-resistant, CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 101 clone carrying an OmpK36 porin variant. *Clin Microbiol.* 2013;**51**(10):3176-82.
- Prabaker K, Lin MY, McNally M, Cherabuddi K, Ahmed S, Norris A, Lolans K, Odeh R, Chundi V, Weinstein RA, Hayden MK; Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Prevention Epicenters Program.** Transfer from high-acuity long-term care facilities is associated with carriage of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a multihospital study. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2012;**33**(12):1193-9.

Pulcrano G, Iula DV, de Luca C, Roscetto E, Vollaro A, Rossano F, Catania MR. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST512 carrying *bla*_{KPC-3} in a hospital in southern Italy. *APMIS*. 2013; **8**.

Qi C, Pilla V, Yu JH, Reed K. Changing prevalence of *Escherichia coli* with CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in outpatient urinary *E. coli* between 2003 and 2008. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;**67**(1):87-91.

Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007;**20**(3):440-58

Reguengo da Luz, M. M. Isolados clínicos de *Enterobacteriaceae* da comunidade, produtoras de β -lactamases de espectro alargado. Tese de Mestrado em Análises Clínicas. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2008.

Reyna-Flores F, Barrios H, Garza-Ramos U, Sánchez-Pérez A, Rojas-Moreno T, Uribe-Salas FJ, Fagundo-Sierra R, Silva-Sanchez J. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O25b-ST131 isolates causing community-acquired UTIs in Mexico. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;**76**(3):396-8.

Rice LB. Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to β -lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones. *Mayo Clin Proc*. 2012;**87**(2):198-208.

Robinson CJ, Bohannan BJ, Young VB. From structure to function: the ecology of host-associated microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010;**74**(3):453-76.

Robustillo Rodela A, Díaz-Agero Pérez C, Sanchez Sagrado T, Ruiz-Garbajosa P, Pita López MJ, Monge V. Emergence and outbreak of carbapenemase-producing KPC-3 *Klebsiella pneumoniae* in Spain, September 2009 to February 2010: control measures. *Euro Surveill*. 2012;**17**(7). pii: 20086.

Rocha J, Ferreira H. Dissemination of extended-spectrum beta-lactamase producers in natural environments in Northern Portugal. *Clin Microbiol Infect* 2006, **12**, S4, 84

Rocha J, Ferreira H. Pattern of extended-spectrum beta-lactamases producers in coastal seawater of Northern Portugal after a four year period. *Clin Microbiol Infect* 2005, **11**, S2, 635

Rocha J, Machado E, Sousa J, Peixe L, Ferreira H. Environmental emergence of multiresistant *Enterobacteriaceae* harbouring *bla*_{CTX-M-15} and *aac(6)'-Ib-cr* in Portugal. *Clin Microbiol Infect* 2008, **14**, S7, 440

Rodrigues, H C D. Colonização fecal de crianças por *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamases de espectro alargado. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 2011

Rodríguez-Baño J, Alcalá JC, Cisneros JM, Grill F, Oliver A, Horcajada JP, Tórtola T, Mirelis B, Navarro G, Cuenca M, Esteve M, Peña C, Llanos AC, Cantón R, Pascual A. Community infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. Arch Intern Med. 2008 22;**168**(17):1897-902.

Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. J Infect Chemother. 2011;**17**(2):149-82.

Rodríguez-Rojas A, Rodríguez-Beltrán J, Couce A, Blázquez J. Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. Int J Med Microbiol. 2013;**303**(6-7):293-7.

Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. J Antimicrob Chemother. 2011 ; **66**(1):1-14.

Rolain JM. Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. Front Microbiol. 2013 ; **24**(4):173.

Rooney PJ, O'Leary MC, Loughrey AC, McCalmont M, Smyth B, Donaghy P, Badri M, Woodford N, Karisik E, Livermore DM. Nursing homes as a reservoir of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* . J Antimicrob Chemother. 2009 ; **64**(3):635-41.

Rosengren LB, Waldner CL, Reid-Smith RJ. Associations between antimicrobial resistance phenotypes, antimicrobial resistance genes, and virulence genes of fecal *Escherichia coli* isolates from healthy grow-finish pigs. Appl Environ Microbiol. 2009;**75**(5):1373-80.

Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. Clin Microbiol Infect. 2008;**14** Suppl 1:33-41.

Ruiz E, Sáenz Y, Zarazaga M, Rocha-Gracia R, Martínez-Martínez L, Arlet G, Torres C. qnr, aac(6')-Ib-cr and qepA genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location. J Antimicrob Chemother. 2012; **67**(4):886-97.

Ruiz-Garbajosa P, Curiao T, Tato M, Gijón D, Pintado V, Valverde A, Baquero F, Morosini MI, Coque TM, Cantón R. Multiclonal dispersal of KPC genes following the emergence of non-ST258 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clones in Madrid, Spain. J Antimicrob Chemother. 2013; **68**(11):2487-92.

Ruppé E, Andreumont A. Causes, consequences, and perspectives in the variations of intestinal density of colonization of multidrug-resistant enterobacteria. Front Microbiol. 2013 28; **4**:129.

Salyers AA, Gupta A, Wang Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. Trends Microbiol. 2004; **12**(9):412-6.

Samra Z, Ofir O, Lishtzinsky Y, Madar-Shapiro L, Bishara J. Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-3 in a tertiary medical centre in Israel. Int J Antimicrob Agents. 2007; **30**(6):525-9.

Sandvang D, Aarestrup FM, Jensen LB. Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. FEMS Microbiol Lett 1997, **157**:177-181.

Schjørring S, Krogfelt KA. Assessment of bacterial antibiotic resistance transfer in the gut. Int J Microbiol. 2011; **31**:2956.

Schmieder R, Edwards R. Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. Future Microbiol. 2012 Jan; **7**(1):73-89.

Schoevaerdt D, Verroken A, Huang TD, Frennet M, Berhin C, Jamart J, Bogaerts P, Swine C, Glupczynski Y. Multidrug-resistant bacteria colonization amongst patients newly admitted to a geriatric unit: a prospective cohort study. J Infect. 2012 ; **65**(2):109-18.

Scott G. Antibiotic resistance. Medicine 2009, **37**(10), 551-556

Seiffert SN, Hilty M, Perreten V, Endimiani A. Extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative organisms in livestock: an emerging problem for human health? 2013; **16**(1-2):22-45.

Sengelov G, Agerso Y, Halling-Sorensen B, Baloda SB, Andersen JS, Jensen LB. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. Environ Int 2003, **28**:587-595.

- Smith CA, Baker EN.** Aminoglycoside antibiotic resistance by enzymatic deactivation. *Curr Drug Targets Infect Disord.* 2002;2(2):143-60.
- Snyder GM, O'Fallon E, D'Agata EM.** Co-colonization with multiple different species of multidrug-resistant gram-negative bacteria. *Am J Infect Control.* 2011; **39**(6):506-10.
- Sommer MO, Church GM, Dantas G.** The human microbiome harbors a diverse reservoir of antibiotic resistance genes. *Virulence.* 2010;1(4):299-303.
- Sorlozano A, Gutierrez J, Jimenez A, de Dios Luna J, Martínez JL.** Contribution of a new mutation in *parE* to quinolone resistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol.* 2007;**45**(8):2740-2.
- Spurbeck RR, Dinh PC Jr, Walk ST, Stapleton AE, Hooton TM, Nolan LK, Kim KS, Johnson JR, Mobley HL.** *Escherichia coli* isolates that carry *vat*, *fyuA*, *chuA*, and *yfcV* efficiently colonize the urinary tract. *Infect Immun.* 2012; **80**(12):4115-22.
- Stenutz R, Weintraub A, Widmalm G.** The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiol Rev.* 2006; **30**(3):382-403.
- Strenger V, Feierl G, Resch B, Zarfel G, Grisold A, Masoud-Landgraf L, Dosch V, Riedl R, Zenz W, Müller W, Urlesberger B.** Fecal carriage and intrafamilial spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* following colonization at the neonatal ICU. *Pediatr Crit Care Med.* 2013; **14**(2):157-63.
- Stuart RL, Kotsanas D, Webb B, Vandergraaf S, Gillespie EE, Hogg GG, Korman TM.** Prevalence of antimicrobial-resistant organisms in residential aged care facilities. *Med J Aust.* 2011 ; **195**(9):530-3.
- Stürenburg E, Mack D.** Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect.* 2003; **47**(4):273-95.
- Suetens C.** Healthcare-associated infections in European long-term care facilities: how big is the challenge? *Euro Surveill.* 2012; **17**(35). pii: 20259.
- Sumer S, Turk Dagi H, Findik D, Arslan U, Aktug Demir N, Ural O, Tuncer I.** Two Outbreaks Due to Esbl-Producing *Klebsiella pneumoniae* in A Neonatal Intensive Care Unit. *Pediatr Int.* 2013; **15**: 1-6.
- Talbot GH.** β -Lactam antimicrobials: what have you done for me lately? *Ann N Y Acad Sci.* 2013; **1277**:76-83.

- Tamma PD, Savard P, Pál T, Sonnevend Á, Perl TM, Milstone AM.** An outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2012; **33**(6):631-4.
- Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E.** The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2010 ;**8**(3):207-17.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995; **33**(9):2233-9.
- Theuretzbacher U.** Resistance drives antibacterial drug development. *Curr Opin Pharmacol.* 2011; **11**(5):433-8.
- Thompson-Chagoyán, O. C., Maldonado, J. and Gil, A.** Colonization and Impact of Disease and Other Factors on Intestinal Microbiota. *Dig Dis Sci* (2007) 52:2069–2077
- Thomson KS.** Detection of gram-negative β -lactamase producing pathogens in the clinical lab. *Curr Pharm Des.* 2013;**19**(2):250-6.
- Tinelli M, Cataldo MA, Mantengoli E, Cadeddu C, Cunietti E, Luzzaro F, Rossolini GM, Tacconelli E.** Epidemiology and genetic characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing Gram-negative bacteria causing urinary tract infections in long-term care facilities. *J Antimicrob Chemother.* 2012; **67**(12):2982-7.
- Tosh PK, McDonald LC.** Infection control in the multidrug-resistant era: tending the human microbiome. *Clin Infect Dis.* 2012 1;**54**(5):707-13.
- Totsika M, Beatson SA, Sarkar S, Phan MD, Petty NK, Bachmann N, Szubert M, Sidjabat HE, Paterson DL, Upton M, Schembri MA.** Insights into a multidrug resistant *Escherichia coli* pathogen of the globally disseminated ST131 lineage: genome analysis and virulence mechanisms. *PLoS One.* 2011; **6**(10):e26578.
- Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL.** Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev.* 2012; **25**(4):682-707.
- Urban C, Bradford PA, Tuckman M, Segal-Maurer S, Wehbeh W, Grenner L, Colon-Urban R, Mariano N, Rahal JJ.** Carbapenem-resistant *Escherichia coli* harboring

Klebsiella pneumoniae carbapenemase beta-lactamases associated with long-term care facilities. Clin Infect Dis. 2008; **46**(11):e127-30.

Urban C, Mariano N, Bradford PA, Tuckman M, Segal-Maurer S, Wehbeh W, Grenner L, Colon-Urban R, Johnston B, Johnson JR, Rahal JJ. Identification of CTX-M beta-lactamases in *Escherichia coli* from hospitalized patients and residents of long-term care facilities. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010; **66**(4):402-6.

Utsumi M, Makimoto K, Quroshi N, Ashida N. Types of infectious outbreaks and their impact in elderly care facilities: a review of the literature. Age Ageing. 2010; **39**(3):299-305.

Valverde A, Grill F, Coque TM, Pintado V, Baquero F, Cantón R, Cobo J. High rate of intestinal colonization with extended-spectrum-beta-lactamase-producing organisms in household contacts of infected community patients. J Clin Microbiol. 2008; **46**(8):2796-9.

van der Bij AK, Pitout JD. The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother. 2012; **67**(9):2090-100.

Van der Donk CF, Schols JM, Driessen CJ, Hagenouw RG, Meulendijks A, Stobberingh EE. Prevalence and spread of multidrug resistant *Escherichia coli* isolates among nursing home residents in the southern part of The Netherlands. J Am Med Dir Assoc. 2013;**14**(3):199-203.

Vaux S, Carbonne A, Thiolet JM, Jarlier V, Coignard B; RAISIN and Expert Laboratories Groups. Emergence of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in France, 2004 to 2011. Euro Surveill. 2011; **16**(22). pii: 19880.

Viau RA, Hujer AM, Marshall SH, Perez F, Hujer KM, Briceño DF, Dul M, Jacobs MR, Grossberg R, Toltzis P, Bonomo RA. "Silent" dissemination of *Klebsiella pneumoniae* isolates bearing *K. pneumoniae* carbapenemase in a long-term care facility for children and young adults in Northeast Ohio. Clin Infect Dis. 2012; **54**(9):1314-21.

Viedma E, Juan C, Villa J, Barrado L, Orellana MA, Sanz F, Otero JR, Oliver A, Chaves F. VIM-2-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175 clone, Spain. Emerg Infect Dis. 2012; **18**(8):1235-41.

Vimont S, Boyd A, Bleibtreu A, Bens M, Goujon JM, Garry L, Clermont O, Denamur E, Arlet G, Vandewalle A. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone O25b: H4-

ST131 has high intestine colonization and urinary tract infection abilities. PLoS One. 2012;7(9):e46547.

Walsh TR, Toleman MA. The emergence of pan-resistant Gram-negative pathogens merits a rapid global political response. J Antimicrob Chemother. 2012; 67(1):1-3.

Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. Int J Antimicrob Agents. 2010; 36 Suppl 3:S8-14.

Wellington EM, Boxall AB, Cross P, Feil EJ, Gaze WH, Hawkey PM, Johnson-Rollings AS, Jones DL, Lee NM, Otten W, Thomas CM, Williams AP. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. Lancet Infect Dis. 2013; 13(2):155-65.

Wiener J, Quinn JP, Bradford PA, Goering RV, Nathan C, Bush K, Weinstein RA. Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. JAMA. 1999, 10;281(6):517-23.

Willems E, Verhaegen J, Magerman K, Nys S, Cartuyvels R. Towards a phenotypic screening strategy for emerging β -lactamases in Gram-negative bacilli. Int J Antimicrob Agents. 2013; 41(2):99-109.

Woerther PL, Burdet C, Chachaty E, Andremont A. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β -lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. Clin Microbiol Rev. 2013; 26(4):744-58.

Woodford N, Tierno PM Jr, Young K, Tysall L, Palepou MF, Ward E, Painter RE, Suber DF, Shungu D, Silver LL, Inglima K, Kornblum J, Livermore DM. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(12):4793-9.

Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev. 2011; 35(5):736-55.

Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME, Turton J, Fagan EJ, James D, Johnson AP, Pike R, Warner M, Cheasty T, Pearson A, Harry S, Leach JB, Loughrey A, Lowes JA, Warren RE, Livermore DM. Community and hospital spread of *Escherichia coli*

producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2004; **54**(4):735-43.

Wright GD. Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? *BMC Biol.* 2010; **20**(8):123.

Zeng X, Lin J. Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Front Microbiol.* 2013; **22**(4):128.

ANEXOS

I - Contagem de UFC/ml no meio de cultura MacConkey agar e meio de cultura MacConkey agar selectivo com antibiótico β -lactâmico do lar de idosos 1

Amostra	UFC/mL				
	mac 1/10S	mac c/ CTX (2 μ g/mL)		mac c/ CAZ (2 μ g/mL)	
		S	sed	S	Sed
1	100 lac ⁺	0	3 lac ⁺	0	0
2	150 lac ⁻	200 lac ⁻	280 lac ⁻	0	0
3	100 lac ⁻	0	0	0	0
4	70 lac ⁺	0	0	0	0
5	80 lac ⁺	1 lac ⁺	0	3 lac ⁺	1 lac ⁺
6	>300 lac ⁺	10 lac ⁺	0	2 lac ⁺	4 lac ⁺
7	50 lac ⁺	18 lac ⁻	15 lac ⁻	0	2 lac ⁻
8	>300 lac ⁺	0	0	0	0
9	100 lac ⁺	0	0	0	0

Legenda: mac - sobrenadante do caldo BHI em meio de MacConkey; mac c/ CTX (2 μ g/mL) - meio de MacConkey com cefotaxima (2 μ g/mL); mac c/ CAZ (2 μ g/mL) - meio de MacConkey com ceftazidima (2 μ g/mL); S - sobrenadante do caldo BHI; sed - sedimento do caldo BHI; lac⁺ - colónias fermentadores da lactose; lac⁻ - colónias não fermentadores da lactose; 0 - ausência de crescimento.

II – Contagem de UFC/ml nos meios de cultura MacConkey agar e MacConkey agar de seleção com antibiótico β -lactâmico das amostras do lar de idosos 2

Amostra	UFC/ml				
	mac 1/10 S	mac c/CTX (2 μ g/ml)		mac c/CAZ (2 μ g/ml)	
		S	sed	S	sed
1	>300 lac ⁻	0	20 lac ⁻	0	0
2	>300 lac ⁺	0	0	0	0
3	>300 lac ⁺	0	0	0	0
4	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	0	5 lac ⁻	4 lac ⁺
5	>300 lac ⁺	0	0	0	0
6	>300 lac ⁺	0	10 lac ⁻	0	0
7	>300 lac ⁺	0	10 lac ⁻	0	0
8	>350 lac ⁺	0	0	0	0
9	>300 lac ⁻	0	0	0	0
10	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	0	0
11	180 lac ⁺ e lac ⁻	0	0	0	0
12	100 lac ⁺	0	0	0	0
13	100 lac ⁺	0	0	0	0
14	100 lac ⁺	0	5 lac ⁻	0	0
15	100 lac ⁺	0	0	0	0
16	100 lac ⁺	3 lac ⁻	4 lac ⁻	0	0
17	>300 lac ⁻	0	0	0	0
18	300 lac ⁺	0	0	0	0
19	100 lac ⁺	>300 lac ⁻	0	0	0
20	300 lac ⁺	0	0	1 lac ⁺	3 lac ⁺
21	149 lac ⁺	3 lac ⁺	3 lac ⁺	0	0

Legenda: mac - sobrenadante do caldo BHI em meio de MacConkey; mac c/ CTX (2 μ g/mL) - meio de MacConkey com cefotaxima (2 μ g/mL); mac c/ CAZ (2 μ g/mL) - meio de MacConkey com ceftazidima (2 μ g/mL); S - sobrenadante do caldo BHI; sed - sedimento do caldo BHI; lac⁺ - colônias fermentadores da lactose; lac⁻ - colônias não fermentadores da lactose; 0 - ausência de crescimento.

III – Contagem de UFC/ml nos meios de cultura MacConkey agar e MacConkey agar de seleção com antibiótico β -lactâmico das amostras do lar de idosos 3

Amostra	UFC/mL				
	mac 1/10 S	mac c/ CTX (2 μ g/mL)		mac c/ CAZ (2 μ g/mL)	
		S	sed	S	sed
1	>300 lac ⁺	2 lac ⁺ , lac ⁺	0	1 c lac ⁺	0
2	>300 lac ⁺	48 lac ⁺	0	30 lac ⁺	15 lac ⁺
3	>300 lac ⁺	0	10 lac ⁻	4 lac ⁻	8 lac ⁻
4	9 lac ⁺	0	0	0	0
5	346 lac ⁺	0	0	0	0
6	>300 lac ⁺	0	0	19 lac ⁺	0
7	>300 lac ⁺	0	19 lac ⁻	10 lac ⁺	0
8	>300 lac ⁺	10 lac ⁺	4 lac ⁺	20 lac ⁺	4 lac ⁺
9	70 lac ⁺	0	0	0	0
10	>300 lac ⁺	0	30 lac ⁺	0	3 lac ⁺
11	>300 lac ⁺	0	4 lac ⁺	0	6 lac ⁺
12	>300 lac ⁺	0	5 lac ⁺	0	2 lac ⁺
13	>300 lac ⁺	1 lac ⁺	12 lac ⁺	0	137 lac ⁺
14	>300 lac ⁺	0	0	0	0
15	>300 lac ⁺	0	0	0	0
16	>300 lac ⁺	0	0	0	0
17	200 lac ⁺	0	2 lac ⁺	0	0
18	>300 lac ⁺	200 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
19	40 lac ⁺	0	200 lac ⁺	0	0
20	>300 lac ⁺	0	0	0	0
21	>300 lac ⁺	28 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	1 lac ⁺
22	>300 lac ⁺	2 lac ⁺	20 lac ⁺	0	21 lac ⁺

Legenda: mac - sobrenadante do caldo BHI em meio de MacConkey; mac c/ CTX (2 μ g/mL) - meio de MacConkey com cefotaxima (2 μ g/mL); mac c/ CAZ (2 μ g/mL) - meio de MacConkey com ceftazidima (2 μ g/mL); S - sobrenadante do caldo BHI; sed - sedimento do caldo BHI; lac⁺ - colônias fermentadores da lactose; lac⁻ - colônias não fermentadores da lactose; 0 - ausência de crescimento.

III (continuação) – Contagem de UFC/ml nos meios de cultura MacConkey agar e MacConkey agar de seleção com antibiótico β -lactâmico das amostras do lar de idosos 3

Amostra	UFC/mL				
	mac 1/10 S	mac c/ CTX (2 μ g/mL)		mac c/ CAZ (2 μ g/mL)	
		S	sed	S	sed
23	>300 lac ⁺	1 lac ⁺	3 lac ⁺	0	0
24	>300 lac ⁺	0	0	0	0
25	200 lac ⁺	0	200 lac ⁻	0	0
26	>300 lac ⁺	0	56 lac ⁻	0	0
27	4 lac ⁺	0	0	0	0
28	>300 lac ⁺	0	0	1 lac ⁻	31 lac
29	234 lac ⁺ , 45 lac ⁻	147 lac ⁺	78 lac ⁺ , 45 lac ⁻	4 lac ⁺	>300 lac ⁺
30	100 lac ⁺	0	0	0	0
31	150 lac ⁺	0	0	0	0
32	256 lac ⁺	46 lac ⁻	30 lac ⁻	0	20 lac ⁺
33	200 lac ⁺	0	0	0	0
34	8 lac ⁺	0	5 lac ⁺	0	0
35	>300 lac ⁺	leveduras	leveduras	leveduras	leveduras
36	>300 lac ⁺	1 lac ⁺	50 lac ⁺	0	0
37	>300 lac ⁺	0	0	leveduras	0

Legenda: mac - sobrenadante do caldo BHI em meio de MacConkey; mac c/ CTX (2 μ g/mL) - meio de MacConkey com cefotaxima (2 μ g/mL); mac c/ CAZ (2 μ g/mL) - meio de MacConkey com ceftazidima (2 μ g/mL); S - sobrenadante do caldo BHI; sed - sedimento do caldo BHI; lac⁺ - colônias fermentadores da lactose; lac⁻ - colônias não fermentadores da lactose; 0 - ausência de crescimento.

IV – Contagem de UFC/ml nos meios de cultura MacConkey agar e MacConkey agar de seleção com antibiótico β -lactâmico das amostras do lar de idosos 4

Amostra	UFC/mL						mac c/ ATM (2µg/mL)
	mac 1/10 S	mac c/ CTX (2µg/mL)		mac c/ CAZ (2µg/mL)			
		S	sed	S	sed		
1	167 lac ⁺	24 lac ⁺	200 lac ⁺	42 lac ⁺	>300 lac ⁺	ni	ni
2	255 lac ⁺	0	0	0	0	ni	ni
3	289 lac ⁺	0	0	0	0	ni	ni
4	124 lac ⁺ e 34 lac ⁻	0	0	0	0	ni	ni
5	200 lac ⁺	0	0	0	0	ni	ni
6	455 lac ⁺	3 lac ⁺	9 lac ⁺	0	0	ni	ni
7	300 lac ⁺	300	300 lac ⁻	9 lac ⁻	0	ni	ni
8	137 lac ⁺	0	0	0	0	ni	ni
9	200 lac ⁺	0	Leveduras	0	0	ni	ni
10	250 lac ⁺	0	5 lac ⁺	0	4 lac ⁺	ni	ni
11	296 lac ⁺ e lac ⁻	69 lac ⁻	100 lac ⁻	0	0	ni	ni
12	300 lac ⁻	300 lac ⁻	300 lac ⁻	28 lac ⁻ leveduras	2 lac ⁺	ni	ni
13	159 lac ⁻	31 lac ⁻	30 lac ⁻	0	0	ni	ni
14	300 lac	300 lac ⁻	300 lac ⁻	21 lac ⁺ , 0	9 lac ⁺	ni	ni
15	90 lac ⁺ e 55 lac ⁻	200 lac ⁻	50 lac ⁻	0	0	ni	ni
16	300 lac ⁺	148 lac ⁻	40 lac ⁻	0	0	ni	ni
17	300 lac ⁺	300 lac ⁻	300 lac ⁻	5 lac ⁻	0	4 lac ⁺	10 lac ⁻ 2 lac ⁺
18	478 lac ⁺	0	0	0	0	0	0
19	139 lac ⁺	50 lac ⁻	3 lac ⁻	0	0	0	0
20	80 lac ⁺	0	0	0	0	0	0
21	168 lac ⁺	Incontável lac ⁻	Incontável lac ⁻	0	Incontável lac ⁻	0	0
22	237 lac ⁺	0	0	0	0	0	0
23	300 lac ⁺	0	0	0	0	0	0
24	300 lac ⁺	0	0	0	0	0	0
25	340 lac ⁺	0	0	0	0	0	0

Legenda: mac 1/10S - diluição 1/10 do sobrenadante do caldo BHI em meio de MacConkey; mac c/ CTX (2 μ g/mL) - meio de MacConkey com cefotaxima (2 μ g/mL); mac c/ CAZ (2 μ g/mL) - meio de MacConkey com ceftazidima (2 μ g/mL); mac c/ ATM (2 μ g/mL) - meio de MacConkey com aztreonam (2 μ g/mL); S - sobrenadante do caldo BHI; sed - sedimento do caldo BHI; lac⁺ - colônias fermentadoras da lactose; lac⁻ - colônias não fermentadoras da lactose; 0 - ausência de crescimento bacteriano; ni - meio não inoculado.

V – Contagem de UFC/ml nos meios de cultura MacConkey agar e MacConkey agar de seleção com antibiótico β -lactâmico das amostras do lar de idosos 5

Amostra	UFC/mL								
	mac 1/10 S	mac c/ CTX (2 μ g/mL)		mac c/ CAZ (2 μ g/mL)		mac c/ ATM (2 μ g/mL)		mac c/ IPM (1 μ g/mL)	
		S	sed	S	sed	S	sed	S	sed
1	120 lac ⁺	0	5	0	0	0	0	ni	ni
2	200 lac ⁺	200 lac ⁺	>300 lac ⁺⁺	1 lac ⁺	8 lac ⁺	150 lac ⁺	150 lac ⁺	ni	ni
3	>300 lac ⁺	0	30 lac ⁺	0	0	0	0	ni	ni
4	>300 lac ⁺	200 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	20 lac ⁺	100 lac ⁺	80 lac ⁺	ni	ni
5	200 lac ⁺	150 lac ⁺	200 lac ⁺	4 lac ⁺	23 lac ⁺	58 lac ⁺	70 lac ⁺	ni	ni
5	60 lac ⁺	0	30 lac ⁺	0	0	0	0	ni	ni
7	68 lac ⁺	0	100 lac ⁺	0	15 lac ⁺	0	0	ni	ni
8	300 lac ⁺	200 lac ⁺	200 lac ⁺	200 lac ⁺	200 lac ⁺	200 lac ⁺	159 lac ⁺ , 47 lac ⁻	ni	ni
9	51 lac ⁺	33 lac ⁺	80 lac ⁺	30 lac ⁺	100 lac ⁺	40 lac ⁺	0	ni	ni
10	40 lac ⁺	100 lac ⁺	100 lac ⁺	100 lac ⁺	100 lac ⁺	100 lac ⁺	0	ni	ni
11	>300 lac ⁺	3 lac ⁺	5 lac ⁺	3 lac ⁺	0	0	0	ni	ni
12	200 lac ⁺	100 lac ⁺	100 lac ⁺	100 lac ⁺	100 lac ⁺	100 lac ⁺	100 lac ⁺	ni	ni
13	40 lac ⁺	70 lac ⁺	70 lac ⁺	70 lac ⁺	70 lac ⁺	70 lac ⁺	70 lac ⁺	ni	ni
14	300 lac ⁺	245 lac ⁺	300 lac ⁺	369 lac ⁺	345 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	ni	ni
15	250 lac ⁺	3 lac ⁺	100 lac ⁺	0	0	0	0	ni	ni
16	8 lac ⁺	0	13 lac ⁺	0	0	0	0	ni	ni
17	250 lac ⁺	55 lac ⁺	200 lac ⁺	80 lac ⁺	»200 lac ⁺	52 lac ⁺	100 lac ⁺	ni	ni
18	70 lac ⁺	100 lac ⁺	100 lac ⁺	150 lac ⁺	80 lac ⁺	100 lac ⁺	70 lac ⁺	ni	ni
19	300 lac ⁺	50 lac ⁻	80 lac ⁻ , 20 lac ⁺	0	80 lac ⁻ , Ox ⁺	50 lac ⁻ , Ox ⁺	50 lac ⁻ , Ox ⁺ , 1 lac ⁺	ni	ni
20	300 lac ⁺	200 lac ⁺	200 lac ⁺	33 lac ⁺	96 lac ⁺	100 lac ⁺	120 lac ⁺	ni	ni
21	300 lac ⁺	167 lac ⁺	Incontáve l lac ⁺ , lac ⁻	47 lac ⁺	203 lac ⁻ , Ox ⁺	9 lac ⁺	134 lac ⁺	ni	ni
22	156 lac ⁺	100 lac ⁺	200 lac ⁺	200 lac ⁺	200 lac ⁺	200 lac ⁺	200 lac ⁺	ni	ni
23	200 lac ⁺	0	0	0	0	0	0	ni	ni
24	269 lac ⁻	200 lac ⁻	100 lac ⁻	200 lac ⁺	100 lac ⁺	150 lac ⁺	100 lac ⁺	ni	ni
25	200 lac ⁻	270 lac ⁻	190 lac ⁻	200 lac ⁻	100 lac ⁻	100 lac ⁺	34 lac ⁺ , 57 lac ⁻	ni	ni
26	200 lac ⁺	10 lac ⁺	50 lac ⁺	23 lac ⁺	34 lac ⁺	17 lac ⁺	30 lac ⁺	ni	ni
27	136 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	200 lac ⁺	178 lac ⁺	ni	ni
28	200 lac ⁻	3 lac ⁻	0	0	0	0	0	ni	ni
29	268 lac ⁺	0	0	0	0	0	0	ni	ni
30	300 lac ⁺	300 lac ⁺	200 lac ⁺	149 lac ⁺	100 lac ⁺	150 lac ⁺	200 lac ⁺	ni	ni
31	300 lac ⁺	340 lac ⁺	37 lac ⁺	200 lac ⁺	30 lac ⁺	300 lac ⁺	45 lac ⁺	300 lac ⁺	0
32	100 lac ⁺	300 lac ⁺	200 lac ⁺	200 lac ⁺	0	150 lac ⁺	50 lac ⁺	300 lac ⁺	50 lac ⁺
33	300 lac ⁺	200 lac ⁺	200 lac ⁺	200 lac ⁺	200 lac ⁺	200 lac ⁺	200 lac ⁺	0	4 lac ⁺
34	237 lac ⁺	13 lac ⁺	30 lac ⁺	25 lac ⁺	40 lac ⁺	20 lac ⁺	42 lac ⁺	0	0
35	184 lac ⁺	2	>300 lac ⁺	8 lac ⁺	0 lac ⁺	14 lac ⁺	0	20 lac ⁺	0

Amostra	UFC/mL								
	mac 1/10 S	mac c/ CTX (2µg/mL)		mac c/ CAZ (2µg/mL)		mac c/ ATM (2µg/mL)		mac c/ IPM (1µg/mL)	
		S	sed	S	sed	S	sed	S	sed
36	378 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	01	0
37	>300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	120 lac ⁺	300 lac ⁺	200 lac ⁺	370 lac ⁺	150 lac ⁻	0
38	>300 lac ⁺	345 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	190 lac ⁺ , leveduras	380 lac ⁺	300 lac ⁺	10 lac ⁺	3 lac ⁺
39	>300 lac ⁺	240 lac ⁺	200 lac ⁺	234 lac ⁺	200 lac ⁺	200 lac ⁺	200 lac ⁺	170 lac ⁺	0
40	>300 lac ⁺	100 lac ⁺	120 lac ⁺	100 lac ⁺	150 lac ⁺	200 lac ⁺	100 lac ⁺	150 lac ⁺	0
41	>300 lac ⁺	106 lac ⁺	70 lac ⁺	100 lac ⁺	90 lac ⁺	100 lac ⁺	50 lac ⁺	Incontável lac ⁺	0
42	>300 lac ⁺	200 lac ⁺	206 lac ⁺	200 lac ⁺	200 lac ⁺	260 lac ⁺	200 lac ⁺	0	0
43	>300 lac ⁺	150 lac ⁺	300 lac ⁺	150 lac ⁺	300 lac ⁺	150 lac ⁺	300 lac ⁺	0	0
44	249 lac ⁺	0	0	0	leveduras	25 lac ⁺	leveduras	0	leveduras
45	>300 lac ⁺	0	0, leveduras	0	leveduras	0	2 lac ⁺ , leveduras	0	0
46	189 lac ⁺	0	0	0	0	0	0	0	1 lac ⁺
47	300 lac ⁺	0	14 lac ⁺	2 lac ⁺	8 lac ⁺	1 lac ⁺	0	2 lac ⁺	0
48	113 lac ⁺	0	1 lac ⁺	0	0	0	0	0	0
49	>300 lac ⁺	70 lac ⁺	134 lac ⁺	1 lac ⁺	leveduras	0	0	100 lac ⁺	0
50	143 lac ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0
51	300 lac ⁺	9 lac ⁺	8 lac ⁺	12 lac ⁺	5 lac ⁺	4 lac ⁺	8 lac ⁺	0	0

Legenda: mac - sobrenadante do caldo BHI em meio de MacConkey; mac c/ CTX (2µg/mL) - meio de MacConkey com cefotaxima (2µg/mL); mac c/ CAZ (2µg/mL) - meio de MacConkey com ceftazidima (2µg/mL); mac c/ ATM (2µg/mL) - meio de MacConkey com aztreonamo (2µg/mL); mac c/ IMP (1µg/mL) - meio de MacConkey com imipenemo (1µg/mL); S - sobrenadante do caldo BHI; sed - sedimento do caldo BHI; lac⁺ - colônias fermentadoras da lactose; lac⁻ - colônias não fermentadoras da lactose; 0 - ausência de crescimento bacteriano; ni - meio não inoculado.

VI – Contagem de UFC/ml nos meios de cultura MacConkey agar e MacConkey agar de seleção com antibiótico β -lactâmico das amostras do lar de idosos 6

Amostra	UFC/mL								
	mac 1/10 S	mac c/ CTX (2 μ g/mL)		mac c/ CAZ (2 μ g/mL)		mac c/ ATM (2 μ g/mL)		mac c/ IMP (1 μ g/mL)	
		S	sed	S	sed	S	sed	S	sed
1	269 lac ⁺	19 lac ⁺	20 lac ⁺	15 lac ⁺	5 lac ⁺ leveduras	10 lac ⁺	12 lac ⁺ leveduras	ni	ni
2	187 lac ⁺	22 lac ⁺	18 lac ⁺	12 lac ⁺	37 lac ⁺ leveduras	19 lac ⁺	11 lac ⁺	ni	ni
3	300 lac ⁺	100 lac ⁺	300 lac ⁺	16 lac ⁺	52 lac ⁺	9 lac ⁺	0	ni	ni
4	478 lac ⁺	1 lac ⁺	leveduras	0	0	0	leveduras	ni	ni
5	298 lac ⁺	0	0	0	0	0	0	ni	ni
6	300 lac ⁺	8 lac ⁺	40 lac ⁺	13 lac ⁺	56 lac ⁺	16 lac ⁺	58 lac ⁺	ni	ni
7	330 lac ⁺	»300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	ni	ni
8	300 lac ⁺	200 lac ⁻	300 lac ⁻	0	0	0	0	ni	ni
9	390 lac ⁺	278 lac ⁻	300 lac ⁻	2 lac ⁺	4 lac ⁺	1 lac ⁺	30 lac ⁺	ni	ni
10	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	2 lac ⁺	0	1 lac ⁺	3 lac ⁺	ni	ni
11	306 lac ⁺	1 lac ⁺	0	0	0	0	0	ni	ni
12	300 lac ⁺	60 lac ⁺	36 lac ⁺	80 lac ⁺	50 lac ⁺	Incontável lac ⁺	40 lac ⁺	ni	ni
13	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	ni	ni
14	300 lac ⁺	0	leveduras	0	0	0	leveduras	ni	ni
15	355 lac ⁺	0	2 lac ⁺	0	0	0	0	ni	ni
16	327 lac ⁺	62 lac ⁺	56 lac ⁺	1 lac ⁺	0	0	0	ni	ni
17	300 lac ⁺	150 lac ⁺	100 lac ⁻	150 lac ⁺	200 lac ⁺	150 lac ⁺	150 lac ⁺	ni	ni
18	300 lac ⁺	>300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	ni	ni
19	300 lac ⁺	>300 lac ⁺	Incontável lac ⁺	1 lac ⁺	Incontável lac ⁺	0	>300 lac ⁺	ni	ni
20	300 lac ⁺	13 lac ⁺	60 lac ⁺	0	0	0	0	0	6 lac ⁺
21	300 lac ⁺	300 lac ⁺	»300 lac ⁺	1 lac ⁺	4 lac ⁺	0	0	0	2 lac ⁺
22	300 lac ⁺	226 lac ⁺	300 lac ⁺	67 lac ⁺	189 lac ⁺	0	0	0	0
23	300 lac ⁺	189 lac ⁺	300 lac ⁺	90 lac ⁺	235 lac ⁺	0	0	0	0
24	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	0	0
25	285 lac ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0
26	498 lac ⁺	0	0	0	0	0	0	0	leveduras
27	300 lac ⁺	11 lac ⁻	>300 lac ⁺ e lac ⁻	0	0	0	0	0	0
28	300 lac ⁺	10 lac ⁺	167 lac ⁺	3 lac ⁺	21 lac ⁺	0	0	0	0
29	300 lac ⁻	1 lac ⁻	300 lac ⁻	leveduras	leveduras	1 lac ⁻	0	0	0
30	330 lac ⁺	0	10 lac ⁺	0	8 lac ⁺	0	6 lac ⁺	0	0

Amostra	UFC/mL								
	mac 1/10 S	mac c/ CTX (2µg/mL)		mac c/ CAZ (2µg/mL)		mac c/ ATM (2µg/mL)		mac c/ IMP (1µg/mL)	
		S	sed	S	sed	S	sed	S	sed
31	386 lac ⁺	200 lac ⁺	Incontáv el lac ⁺	5 lac ⁺	18 lac ⁺	0	2 lac ⁺	0	levedura s
32	300 lac ⁺	200 lac ⁺	300 lac ⁺	200 lac ⁺	60 lac ⁺	0	2 lac ⁺	0	levedura s
33	300 lac ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0
34	300 lac ⁺	342 lac ⁺	Incontáv el lac ⁺	378 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	288 lac ⁺	0	10 lac ⁺
35	200 lac ⁺	Incontáv el lac ⁺	70 lac ⁺	14 lac ⁺	59 lac ⁺	0	63 lac ⁺	0	100 lac ⁺
36	335 lac ⁺	Incontáv el lac ⁺	0	0	0	0	0	0	0
37	200 lac ⁺	0	19 lac ⁺	0	0	0	1 lac ⁺	0	0
38	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	0	26 lac ⁺
39	300 lac ⁺	112 lac ⁺	50 lac ⁺	44 lac ⁺	150 lac ⁺	0	0	0	0
40	273 lac ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0
41	250 lac ⁺	245 lac ⁺	300 lac ⁺	230 lac ⁺	300 lac ⁺	130 lac ⁺	0	0	0

Legenda: mac - sobrenadante do caldo BHI em meio de MacConkey; mac c/ CTX (2µg/mL) - meio de MacConkey com cefotaxima (2µg/mL); mac c/ CAZ (2µg/mL) - meio de MacConkey com ceftazidima (2µg/mL); mac c/ ATM (2µg/mL) - meio de MacConkey com aztreonamo (2µg/mL); mac c/ IMP (1µg/mL) - meio de MacConkey com imipenemo (1µg/mL); S - sobrenadante do caldo BHI; sed - sedimento do caldo BHI; lac⁺ - colônias fermentadores da lactose; lac⁻ - colônias não fermentadores da lactose; 0 - ausência de crescimento bacteriano; ni - meio não inoculado.

VII – Contagem de UFC/ml nos meios de cultura MacConkey agar e MacConkey agar de seleção com antibiótico β -lactâmico das amostras do lar de idosos 7

Amostra	UFC/mL									
	mac 1/10	mac c/ CTX (2µg/mL)		mac c/ CAZ (2µg/mL)		mac c/ ATM (2µg/mL)		mac c/ IMP (1µg/mL)		
	S	S	sed	S	sed	S	sed	S	sed	
1	>300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	0	0	
2	>300 lac ⁺	477 lac ⁺	300 lac ⁺	4 lac ⁺	300 lac ⁺	37 lac ⁺	300 lac ⁻	0	0	
3	>300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	0	300 lac ⁺	0	0	0	leveduras	
4	>300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	4 lac ⁺	300 lac ^{-/+}	120 lac ⁺	300 lac ⁺	0	0	
5	>300 lac ⁺	300 lac ⁻	45 lac ⁺	1 lac ⁺	41 lac ⁺	40 lac ⁺	4 lac ⁺	35 lac ^{+/-}	0	
6	>300 lac ⁺	300 lac ⁻	300 lac ⁻	300 lac ^{-/+}	300 lac ⁻	300 lac ^{-/+}	300 lac ^{-/+}	0	0	
7	>300 lac ⁺	49 lac ⁺	0	0	0	0	0	0	0	
8	>300 lac ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0	
10	>300 lac ⁺	3 lac ⁺	6 lac ⁺	1 lac ⁺	2 lac ⁺	3 lac ⁺	3 lac ⁺	0	0	
11	>300 lac ⁺	0	6 lac ⁺	1 lac ⁺	300 lac ⁺	1 lac ⁺	4 lac ⁺	0	leveduras	
12	>300 lac ⁺	8 lac ⁺	300 lac-	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	0	0	
13	>300 lac ⁺	10 lac ⁺	300 lac ⁺	0 lac ⁺	12 lac ⁺	0	0	0	0	
14	>300 lac ⁺	300 lac ⁺	leveduras	0	0	0	0	0	0	
15	>300 lac ^{+/-}	9 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	0	0	
16	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0	
17	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0	
18	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0	
19	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0	
20	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0	
21	>300 lac ⁺	0	77 lac ⁺	30 lac ⁺	72 lac ⁺	0	0	0	0	
22	>300 lac ⁺	0	0	8 lac ⁺	0	0	0	0	0	
23	>300 lac ⁻	20 lac-	300 lac ^{+/-}	14 lac ⁺	7 lac ⁺	73 lac ⁺	2 lac ⁺	0	0	
24	>300 lac ⁺	3 lac ⁺	30 lac ^{+/-}	30 lac ^{+/-}	30 lac ^{+/-}	1 lac ⁺	0	0	0	
25	>300 lac ⁺	>300 lac ^{+/-}	3 lac ⁺	1 lac ^{+/-}	18 lac ^{+/-}	15 lac ^{+/-}	106 lac ⁺	0	0	
26	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0	
27	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0	
28	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0	
29	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0	
30	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0	
31	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0	
32	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0	
33	>300 lac ⁺	3 lac ⁺	0	3 lac ⁺	1 lac ⁺	0	0	0	0	
34	>300 lac ⁺	300 lac-	300 lac-	300 lac ⁻	300 lac-	300 lac ^{-/+}	300 lac ⁺	0	0	
35	>300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	0	0	
36	>300 lac ⁺	35 lac ⁺	20 lac ⁺	50 lac ⁺	300 lac ⁺	32 lac ⁺	28 lac ⁺	0	0	
37	>300 lac ⁺	3 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0	
38	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0	
39	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0	
40	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0	
41	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0	

42									
43	300 lac ^{+/-}	300 lac ⁻	300 lac ⁻	300 lac ⁻	300 lac ⁻	300 lac ⁻	300 lac ⁻	300 lac ⁻	300 lac ⁻
44	300 lac ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0
45	300 lac ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0
46	300 lac ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0
47	300 lac ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0
48	300 lac ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0
49	300 lac ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0
50	300 lac ^{+/-}	300 lac ⁻	300 lac ⁻	300 lac ⁻	300 lac ⁻	300 lac ⁻	300 lac ⁻	0	0
51	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	0	0
52	300 lac ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0
53	>300 lac ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0
54	>300 lac ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0
55	>300 lac ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0
56	>300 lac ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0
57	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	300 lac ⁺	300 lac ⁺	0	0
58	>300 lac ^{+/-}	0	0	0	0	0	0	0	0
59	>300 lac ^{+/-}	0	0	0	0	0	0	0	0
60	>300 lac ^{+/-}	0	0	0	0	0	0	0	0
61	200lac ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0
62	300 lac ^{+/-}	0	0	0	0	0	0	0	0
63	>300 lac ⁺	0	54	0	60	0	62	0	22lac-
64	>300 lac ⁺	0	3 lac ⁺	1 lac ⁺	0	0	0	0	0

Legenda: mac - sobrenadante do caldo BHI em meio de MacConkey; mac c/ CTX (2µg/mL) - meio de MacConkey com cefotaxima (2µg/mL); mac c/ CAZ (2µg/mL) - meio de MacConkey com ceftazidima (2µg/mL); mac c/ ATM (2µg/mL) - meio de MacConkey com aztreonamo (2µg/mL); mac c/ IMP (1µg/mL) - meio de MacConkey com imipenemo (1µg/mL); S - sobrenadante do caldo BHI; sed - sedimento do caldo BHI; lac⁺ - colônias fermentadores da lactose; lac⁻ - colônias não fermentadores da lactose; 0 - ausência de crescimento bacteriano; ni - meio não inoculado.

VIII – Contagem de UFC/ml nos meios de cultura MacConkey agar e MacConkey agar de seleção com antibiótico β -lactâmico das amostras da UCCI 1

Amostra	UFC/mL								
	mac	mac c/ CTX (2 μ g/mL)		mac c/ CAZ (2 μ g/mL)		mac c/ ATM (2 μ g/mL)		mac c/ IMP (1 μ g/mL)	
		S	sed	S	sed	S	sed	S	sed
1	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁻ Ox ⁺	0
2	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	3 lac ⁻ , Ox ⁺	30 lac ⁻ Ox ⁺
3	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ⁻ Ox ⁺	>300 lac ⁻ Ox ⁺
4	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
5	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0
6	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	0	0
7	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ^{+/-}	0	12la c-, ox+
8	>300 lac ⁺	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	0	0
9	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
10	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺ , ox+	>300 lac ⁺ , ox+
11	>300 lac ⁺	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ^{+/-}	0	28la c-, ox+
12	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
13	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
14	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
17	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
18	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	0	0
19	>300 lac	>300 lac ⁻	>300 lac ^{-/+}	>300 lac ⁻	>300 lac ^{-/+}	>300 lac ^{-/+}	>300 lac ^{-/+}	0	0

Legenda: mac - sobrenadante do caldo BHI em meio de MacConkey; mac c/ CTX (2 μ g/mL) - meio de MacConkey com cefotaxima (2 μ g/mL); mac c/ CAZ (2 μ g/mL) - meio de MacConkey com ceftazidima (2 μ g/mL); mac c/ ATM (2 μ g/mL) - meio de MacConkey com aztreonam (2 μ g/mL); mac c/ IMP (1 μ g/mL) - meio de MacConkey com imipenem (1 μ g/mL); S - sobrenadante do caldo BHI; sed - sedimento do caldo BHI; lac⁺ - colônias fermentadoras da lactose; lac⁻ - colônias não fermentadoras da lactose; 0 - ausência de crescimento bacteriano; ni - meio não inoculado.

IX – Contagem de UFC/ml nos meios de cultura MacConkey agar e MacConkey agar de seleção com antibiótico β -lactâmico das amostras da UCCI 2

Amostra	UFC/mL								
	mac	mac c/ CTX (2µg/mL)		mac c/ CAZ (2µg/mL)		mac c/ ATM (2µg/mL)		mac c/ IMP (1µg/mL)	
		S	sed	S	sed	S	sed	S	sed
1	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
2	>300 lac ⁺	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻
3	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	0	0
4	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
5	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
6	>300 lac ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0
7	>300 lac ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0
8	>300 lac ⁺	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	0	0
10	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
11	>300 lac ⁺	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ^{+/-}	0	0
12	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
13	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
14	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
15	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
16	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
17	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
18	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
19	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0

Legenda: mac - sobrenadante do caldo BHI em meio de MacConkey; mac c/ CTX (2 μ g/mL) - meio de MacConkey com cefotaxima (2 μ g/mL); mac c/ CAZ (2 μ g/mL) - meio de MacConkey com ceftazidima (2 μ g/mL); mac c/ ATM (2 μ g/mL) - meio de MacConkey com aztreonam (2 μ g/mL); mac c/ IMP (1 μ g/mL) - meio de MacConkey com imipenem (1 μ g/mL); S - sobrenadante do caldo BHI; sed - sedimento do caldo BHI; lac⁺ - colônias fermentadoras da lactose; lac⁻ - colônias não fermentadoras da lactose; 0 - ausência de crescimento bacteriano; ni - meio não inoculado.

X – Contagem de UFC/ml nos meios de cultura MacConkey agar e MacConkey agar de seleção com antibiótico β -lactâmico das amostras da UCCI 3

Amostra	UFC/mL								
	mac	mac c/ CTX (2 μ g/mL)		mac c/ CAZ (2 μ g/mL)		mac c/ ATM (2 μ g/mL)		mac c/ IMP/ETP (1 μ g/mL)	
		S	sed	S	sed	S	sed	S	sed
1	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻
2	>300 lac ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0
3	>300 lac ⁺	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻
4	>300 lac ⁺	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻
5	>300 lac ⁺	94 lac ⁻	0	0	0	0	0	0	0
6	>300 lac ⁺	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻	5 lac ^{+/-}	>300 lac ⁻
7	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁻	>300 lac ⁻
8	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
9	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺		
10	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
11	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
12	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}		
13	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
14	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
15	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
16	>300 lac ⁺	0	0	>300 lac ⁻	>300 lac ^{+/-}	0	0	0	0
17	>300 lac ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0
18	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
19	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
20	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	0	0
21	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	0	0
22	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	0	0
23	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
24	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	50 lac ⁻	
25	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	0	0
26	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	0	0
27	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺

Amostra	UFC/mL								
	mac	mac c/ CTX (2µg/mL)		mac c/ CAZ (2µg/mL)		mac c/ ATM (2µg/mL)		mac c/ IMP/ETP (1µg/mL)	
		S	sed	S	sed	S	sed	S	sed
28	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/}	>300 lac ^{+/-}	0	0
29	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	150lac ⁺ /-
30	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/}	>300 lac ^{+/-}	0	0
31	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	10 lac ⁺	10 lac ⁺
32	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
33	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/}	>300 lac ^{+/-}	0	0
34	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	120lac ⁺ /-	120lac ⁺ /-
35	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	78 lac ⁺	80 lac ⁺
36	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
37	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	>300 lac ⁺	0	0
38	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/}	>300 lac ^{+/-}	>300 lac ^{+/}	>300 lac ^{+/-}	0	0

Legenda: mac - sobrenadante do caldo BHI em meio de MacConkey; mac c/ CTX (2µg/mL) - meio de MacConkey com cefotaxima (2µg/mL); mac c/ CAZ (2µg/mL) - meio de MacConkey com ceftazidima (2µg/mL); mac c/ ATM (2µg/mL) - meio de MacConkey com aztreonamo (2µg/mL); mac c/ IMP ou MRP (1µg/mL) - meio de MacConkey com imipenemo ou meropenemo (1µg/mL); S - sobrenadante do caldo BHI; sed - sedimento do caldo BHI; lac⁺ - colônias fermentadores da lactose; lac⁻ - colônias não fermentadores da lactose; 0 - ausência de crescimento bacteriano; ni - meio não inoculado.